

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**COMBINATORIA DE 5-FLUOROURACILO Y CISPLATINO CON
INHIBIDORES DE COLINA QUINASA α COMO NUEVA
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE COLON Y EN
CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO**

TESIS DOCTORAL
ANA DE LA CUEVA HERRERA
Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Combinatoria de 5-fluorouracilo y cisplatino con inhibidores de colina quinasa α como nueva alternativa terapéutica en cáncer de colon y en cáncer de pulmón no microcítico.

Memoria que presenta **Dña. Ana de la Cueva Herrera**,
Licenciada en Farmacia, para optar al grado de Doctor

Directores de la Tesis:

Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán

Profesor de Investigación del CSIC

Dra. Ana Ramírez de Molina

Investigadora Senior IMDEA

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM
C/Arturo Duperier 4, 28029 Madrid

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y en el Centro Nacional de Biotecnología, pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid. Ha sido dirigido por el Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán (Profesor de Investigación del CSIC) y la Dra. Ana Ramírez de Molina, (Investigadora Senior y Coordinadora Científica de IMDEA Alimentación) con la Tutoría de la Dra. Isabel Correas Hornero (Catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid). La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca JAE Predoc, concedida a Ana de la Cueva Herrera por el CSIC.

Agradecimientos

Agradecimientos

Agradezco a mis directores de tesis, a Juan Carlos Lacal por haberme brindado la oportunidad de entrar en este laboratorio y haberme formado en el mundo de la investigación y a Ana Ramírez de Molina, por todo lo que me has enseñado como científica y como persona, gracias por tu apoyo desde el primer hasta el último momento de esta tesis.

Gracias al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por haberme concedido la beca que me ha sustentado estos cuatro años. Gracias al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Centro Nacional de Biotecnología por sus servicios e infraestructuras.

Por supuesto, a todos mis compañeros del laboratorio porque gracias a todos vosotros ha sido posible esta tesis. Al laboratorio 1.10 y al 35, a los que están y a la gente que se ha ido, agradeceremos todo lo que me habéis ayudado estos cuatro años, gracias por vuestro apoyo y consejos.

A mis amigos y a mi familia, gracias por vuestro apoyo incondicional y por haber creído en mí.

Resumen

Portada: Tejido normal de colon.

The Human Protein Atlas. Berglund L et al. A gene-centric human protein atlas for expression profiles based on antibodies. Mol Cell Proteomics 2008 (10):2019-27.

Diseño de la portada: Servicio de Imagen Científica, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid.

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer de pulmón suponen dos de las mayores causas de muerte por cáncer en el mundo. El 5-Fluorouracilo (5-FU) y el cisplatino son los fármacos más utilizados en quimioterapia para CCR y pulmón respectivamente. En las últimas décadas se han utilizado en combinación con otros agentes antitumorales con los que se han obtenido mejores tasas de respuesta. Sin embargo, es aún necesario el desarrollo de nuevas estrategias que ofrezcan mayor eficacia y menor toxicidad. La colina quinasa alfa (ChoK α), es una enzima que tiene un papel clave en proliferación celular y transformación celular, encontrándose sobreexpresada en diferentes tipos de tumores. Inhibidores específicos de esta enzima, como MN58b y RSM932A, presentan una potente actividad antiproliferativa y antitumoral en diferentes líneas tumorales.

En este trabajo hemos evaluado el efecto de los inhibidores de ChoK α en combinación con 5-FU y cisplatino como nuevas alternativas en el tratamiento del CCR y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La combinación de los inhibidores con el 5-FU resultó sinérgica *in vitro* en tres líneas tumorales derivadas de adenocarcinomas colorrectales, validándose *in vivo* en xenografías de ratones inmunodeprimidos. A continuación, se estudió el mecanismo molecular que explica este sinergismo, evaluando la modulación del ARNm de enzimas que intervienen en el mecanismo de acción del 5-FU cuando se trata con los inhibidores de ChoK α , como la timidilato sintasa (TS), desoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa) y ribonucleótido reductasa 2 (RRM2).

La combinación de los inhibidores de ChoK α con el cisplatino también resultó sinérgica en dos líneas tumorales derivadas de CPNM *in vitro*, validándose *in vivo* en xenografías de ratones inmunodeprimidos. Dado que en pacientes con CPNM ChoK α ha sido descrita como un nuevo marcador de pronóstico, hemos evaluado la resistencia intrínseca de muestras de pacientes con CPNM a la inhibición de ChoK α , así como a otros fármacos convencionales como cisplatino. En este estudio hemos encontrado que el patrón de resistencia a fármacos convencionales es diferente al obtenido al estudiar la resistencia a la inhibición de ChoK α , validando el uso de la combinación de fármacos convencionales con inhibidores de ChoK α como una prometedora nueva alternativa de tratamiento para pacientes con este tipo de cáncer.

Summary

Colorectal and lung cancer are the major cause of cancer related deaths worldwide. 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin are widely used for the treatment of colorectal and lung cancer respectively but as a single-agents they render low response rates. During last decades, they have been combined with other antitumoral drugs, these combinations provide better responses. Despite the achieved improvements over the past years, the design of novel targeted and combined therapies is still necessary. Choline kinase alpha (ChoK α), a phospholipid-related enzyme that plays a role in cell proliferation and transformation, has been found overexpressed in many different tumors. ChoK α specific inhibitors, MN58b and RSM932A, have potent antitumoral activity both *in vitro* and *in vivo* against several tumor-derived cell lines.

In this work, we have evaluated the effect of ChoK α inhibitors in combination with 5-FU and cisplatin as new alternatives for the treatment of colon and lung cancer. The combination of ChoK α inhibitors with 5-FU resulted in a synergistic effect *in vitro* in three different human colon cancer cell lines, and *in vivo* against human colon xenografts in nude mice. To elucidate the mechanism of the observed synergistic effect, we examined the modulation of mRNA in some enzymes related with 5-FU mechanism when we treated with ChoK α inhibitors such as thymidylate synthase (TS), deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) and ribonucleotide reductase 2 (RRM2),

Moreover, cisplatin and ChoK α inhibitors combination resulted synergistic *in vitro* in two non small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and was also validated *in vivo* against human lung xenografts, in nude mice. Since ChoK α has been described as a prognostic marker in patients with NSCLC we have evaluated intrinsic resistance in samples from NSCLC against ChoK α inhibition and other drugs used in clinic. Here, we found a resistance pattern for drugs used in conventional therapy to be different to that of ChoK α inhibition. Thus we have validated the combination therapy between conventional drugs and ChoK α inhibitors as a new approach in the treatment of patients with lung cancer.

ÍNDICE

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	- 3 -
2	INTRODUCCIÓN.....	- 7 -
2.1	Cáncer	- 7 -
2.2	Cáncer colorrectal.....	- 8 -
2.2.1	Biología molecular del cáncer colorrectal	- 10 -
2.2.2	Tratamiento de cáncer colorrectal.....	- 12 -
2.2.3	Resistencia al tratamiento	- 17 -
2.3	Cáncer de pulmón	- 18 -
2.3.1	Biología molecular del cáncer de pulmón	- 19 -
2.3.2	Tratamiento de cáncer de pulmón	- 20 -
2.4	Colina quinasa como diana terapéutica.....	- 22 -
3	OBJETIVOS	- 29 -
4	MATERIALES Y MÉTODOS	- 33 -
4.1	Fármacos	- 33 -
4.2	Cultivos celulares.....	- 33 -
4.3	Análisis de viabilidad celular	- 34 -
4.4	Ensayos de combinación.....	- 34 -
4.5	Generación de líneas celulares resistentes a fármacos	- 35 -
4.5.1	Líneas celulares H460 resistentes a MN58b y RSM932A.....	- 35 -
4.6	Evaluación del efecto antiproliferativo al combinar los fármacos	- 35 -
4.7	Ensayos de actividad antitumoral <i>in vivo</i>	- 36 -
4.8	Muestras de pacientes.....	- 37 -

4.9	Cultivos primarios de tumores de CPNM.....	38 -
4.10	Ensayos de citometría de flujo	38 -
4.11	Extracción de ARN total procedente de líneas celulares.....	39 -
4.12	Análisis estadístico	39 -
4.13	Consideraciones éticas	39 -
5	RESULTADOS	43 -
5.1	Terapia combinatoria en cáncer colorrectal.....	43 -
5.1.1	Efectividad de la terapia combinada de inhibidores de ChoK α con 5-FU en cáncer colorrectal.....	43 -
5.1.2	Efecto antitumoral obtenido al combinar inhibidores de ChoK α y 5-FU en xenografías de ratones inmunodeprimidos.....	48 -
5.1.3	Los inhibidores de ChoK α modulan los niveles de ARNm de enzimas clave de la ruta de metabolización del 5-FU.....	52 -
5.1.4	La inhibición de ChoK α induce la disminución de los niveles de ARNm de TS, RRM2 y DUT en DLD-1, SW620 y HT29.	52 -
5.2	Terapia combinatoria en cáncer de pulmón	55 -
5.2.1	Resistencia intrínseca a la inhibición de ChoK α por MN58b y otros fármacos antitumorales utilizados en clínica en pacientes con CPNM.....	55 -
5.2.2	Resistencia adquirida a la inhibición de ChoK α por MN58b	58 -
5.2.3	Estudio de la resistencia cruzada entre MN58b y cisplatino	59 -
5.2.4	Efectividad de la terapia combinada con cisplatino y los inhibidores de ChoK α en CPNM.....	60 -
5.2.5	Efecto <i>in vivo</i> de la combinación de los inhibidores de ChoK α y cisplatino en xenografías de CPNM	61 -
6	DISCUSIÓN	67 -
6.1	Cáncer colorrectal	69 -
6.2	Cáncer de pulmón	76 -
7	CONCLUSIONES.....	81 -

8	BIBLIOGRAFÍA.....	- 85 -
9	ANEXO	- 99 -
	9.1 Curriculum Vitae.....	- 99 -

Abreviaturas

1 Abreviaturas

- 5-FU: 5-Fluorouracilo
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AJCC: Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer
- ARN: Ácido ribonucleico
- ATCC: American Type Culture Collection
- CCR: Cáncer colorrectal
- cDDP: Cisplatino
- CH₂THF: Metilentetrahidrofolato
- Cho: Colina
- ChoK: Colina quinasa
- CPM: Cáncer de pulmón microcítico
- CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico
- CT: Citidiltransferasa
- DHFU: Dihidrofluorouracilo
- DMEM: Medio *Eagle* Modificado por Dubelcco
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- dNTP: Desoxirribonucleótido
- dUTPasa, DUT: Desoxiuridina trifosfatasa
- dUMP: Desoxiuridina monofosfato
- dUTP: Desoxiuridina trifosfato
- dTMP: Desoxitimidina monofosfato o Timidilato
- dTTP: Desoxitimidina trifosfato
- ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- FdUMP: Fluorodeoxiuridina monofosfato
- FdUTP: Fluorodesoxiuridina trifosfato
- FPGS: Folilpoliglutamato sintasa
- FUTP: Fluorouridina trifosfato

- HC-3: Hemicolinio-3
- HNPCC: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
- IAPs: Proteínas inhibidoras de la apoptosis
- IC: Índice de combinación
- IP: Ioduro de propidio
- MAPKs: Proteínas quinasas mitógeno-activadas
- MEM: Medio Mínimo Esencial de *Eagle*
- MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
- PAF: Poliposis adenomatosa familiar
- PC: Fosfatidilcolina
- PCho: Fosfocolina
- PI3K: Fosfoinosítido 3 quinasa
- PLD: Fosfolipasa D
- pRb: Proteína del retinoblastoma
- RPMI1640: Instituto Memorial *Roswell Park*
- RRM2: Ribonucleótido reductasa 2
- SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido
- TS, *TYMS*: Timidilato sintasa
- UDG: Uracil-ADN glicosilasa
- UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

Introducción

2 Introducción

2.1 Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2008, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se diagnosticaron 12,3 millones de nuevos casos y fue responsable de la muerte de 7,6 millones de personas en todo el mundo (Globocan, 2008).

El cáncer es un conjunto de enfermedades, que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales, bien por aumento de su proliferación y/o por la inhibición de procesos de muerte celular, que pueden invadir tejidos cercanos o diseminarse a otros órganos en un proceso que da lugar a metástasis o propagación a distancia por vía linfática o sanguínea de las células tumorales a un órgano distinto del que se inició. Las células que forman el tumor metastásico conservan características del tumor original (primario).

Las células tumorales se generan por la acumulación de alteraciones en su material genético, que pueden ser producidas por agentes externos como la radiación, productos químicos o agentes infecciosos (virus, bacterias, etc.); o fallos en los procesos celulares intrínsecos. El resultado es lo que Hanahan y Weinberg describen como “Hallmarks of cancer” (Hanahan and Weinberg, 2000). Ellos proponen que la transformación maligna de las células normales se caracteriza por la adquisición progresiva de cambios genéticos que confieren a las células tumorales las siguientes propiedades:

- Capacidad de proliferación no regulada e independiente de señales mitogénicas.
- Insensibilidad a la señalización antiproliferativa.
- Evasión de la muerte celular programada (apoptosis).
- Potencial de replicación ilimitado.
- Capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).
- Invasión de tejidos circundantes y la capacidad de diseminación y metástasis a órganos distantes del sitio de crecimiento original.

Recientemente estas características han sido incrementadas con factores adicionales que incluyen la desregulación del balance energético, la evasión de la

respuesta inmune, la inestabilidad génica y los procesos de inflamación (Hanahan and Weinberg, 2011).

Puesto que el cáncer es una de las principales causas de muerte, es necesario desarrollar nuevas herramientas y métodos de detección precoz, que ayuden a tener más precisión a la hora de tratar esta enfermedad y que den como resultado un aumento de la esperanza de vida de los pacientes.

Por tanto, es importante conocer la histología del tumor y su fase de desarrollo para decidir cuál es el mejor tratamiento y predecir el pronóstico del paciente. La investigación de nuevas dianas terapéuticas y el conocimiento de los mecanismos moleculares de aparición y progresión de un tumor son esenciales en la lucha contra el cáncer.

2.2 Cáncer colorrectal

El cáncer de colon es uno de los tumores más frecuentes en los países desarrollados tanto en hombres como en mujeres. Actualmente, se presenta como un problema de salud pública importante debido a su alta incidencia y mortalidad. En 2008, en Europa se diagnosticaron 435.600 nuevos casos y fue responsable de 212.100 muertes (Ferlay et al., 2010) ocupando el primer puesto en incidencia y el segundo en mortalidad, después del cáncer de pulmón. En España, según los datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), se diagnostican aproximadamente 21.000 casos nuevos cada año.

En los últimos años se ha observado un aumento de la supervivencia de los pacientes debido principalmente al avance de las técnicas quirúrgicas (tanto del tumor primario como de las metástasis), un mejor conocimiento de la biología molecular del cáncer, el desarrollo de nuevos antitumorales y la utilización de fármacos dirigidos contra dianas moleculares específicas.

El origen de la mayoría de los casos de CCR consiste en pólipos, que son lesiones que protruyen desde la pared intestinal a la luz. Existen varios tipos según sus características histopatológicas, siendo los más frecuentes los adenomatosos, que comprenden el 60-70% de los casos, seguidos de los hiperplásicos (10-30%) y miscelánea.

Estos crecimientos celulares generalmente son benignos pero a medida que aumentan de tamaño y van acumulando lesiones neoplásicas se forma el tumor maligno o carcinoma. El adenocarcinoma supone el 95% de los carcinomas colorrectales, es un tumor de células epiteliales malignas, que comienza en el epitelio glandular de la mucosa colorrectal invadiendo la pared e infiltrándose hacia la mucosa, la submucosa y la lámina propia (figura 1). El cáncer de colon tiene buen pronóstico cuando se detecta en estadios tempranos. El pronóstico está relacionado con el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal, la afectación ganglionar y la existencia o no de metástasis a distancia.

Es muy importante conocer el estadio de la enfermedad, ya que ofrece información acerca del pronóstico y permite planificar el tratamiento del paciente. El sistema Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM) y la clasificación de Dukes son los sistemas de estadificación más utilizados y recomendados (tabla 1). El sistema TNM es utilizado por el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC) y por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (Compton and Greene, 2004).

Tumor primario		Clasificación TNM de la UICC							
Tx	No se puede evaluar el tumor primario.								
T0	No existen signos de tumor primario.								
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial o que invade lamina propia								
T1	Tumor que invade submucosa.								
T2	Tumor que invade el músculo.								
T3	Tumor que invade subserosa, tejidos pericólicos o perirrectales no recubiertos de peritoneo.								
T4	Tumor que invade directamente otros órganos o estructuras adyacentes y/o perfora peritoneo								
Afectación ganglionar									
N0	No metástasis en los ganglios regionales.								
N1	Metástasis de uno a tres ganglios linfáticos.								
N2	Metástasis en más de cuatro ganglios linfáticos.								
Metástasis a distancia									
M0	No hay metástasis a distancia.								
M1	Metástasis a distancia.								
Comparación del estadio por grupos TMN y sus equivalentes en la clasificación Dukes/Modified Astler-Coller									
Carcinoma oculto	Estadio 0	Estadio I	Dukes	Estadio II	Dukes	Estadio III	Dukes	Estadio IV	Dukes
TxN ₀ M ₀	TisNOM0	IA T1NOM0 A IB T2NOM0 B1		IIA T3NOM0 B2 IIB T4NOM0 B3		IIIA T1-2N1M0 C1 IIIB T3-4N1M0 C2 IIIC Cualquier T N2M0 C3		Cualquier T cualquier N M1	D

Tabla 1. Clasificación del cáncer colorrectal según la AJCC y Dukes. Según la clasificación T, N y M de cada tumor se organizan dentro de los estadios I, II, III o IV.

2.2.1 Biología molecular del cáncer colorrectal

Los tratamientos actuales que se utilizan en el cáncer de colon se basan fundamentalmente en el estadio patológico o etapa en la que se encuentra el tumor. En la última década, los avances en farmacogenómica han permitido identificar la influencia de las variaciones genéticas en la respuesta al tratamiento. Diversos estudios han demostrado que el perfil de expresión génica y el análisis farmacogenético de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes relacionados con el metabolismo de los fármacos, angiogénesis y el medio en el que se encuentra el tumor, contribuyen en la variabilidad interindividual a la eficacia del tratamiento y la respuesta clínica. La identificación de marcadores de pronóstico y predictivos de respuesta, permiten tomar decisiones sobre los casos que se deben tratar y con qué fármaco o combinación de fármacos. La identificación y validación de estos marcadores permitirá a los oncólogos clínicos seleccionar a los pacientes con respecto a los tratamientos más eficaces y menos tóxicos gracias al conocimiento del perfil molecular del paciente y del tumor.

La transición de epitelio normal a adenoma o carcinoma está asociada a cambios genéticos, correlacionados con las etapas de la progresión tumoral (figura 1) (Fearon and Vogelstein, 1990; Lengauer et al., 1998). Durante el proceso de carcinogénesis se producen mutaciones, metilaciones y deleciones en los sistemas del control de la proliferación celular, como las rutas de transducción de señales mitogénicas, ciclo celular y apoptosis. Esto tiene como consecuencia la activación de oncogenes y la desactivación de genes supresores de tumores.

El 90% de los casos de CCR suele ser de tipo esporádico mientras que el 10% restante son de carácter hereditario. Dentro de las neoplasias hereditarias destacan dos síndromes como la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) también conocido como síndrome de Lynch.

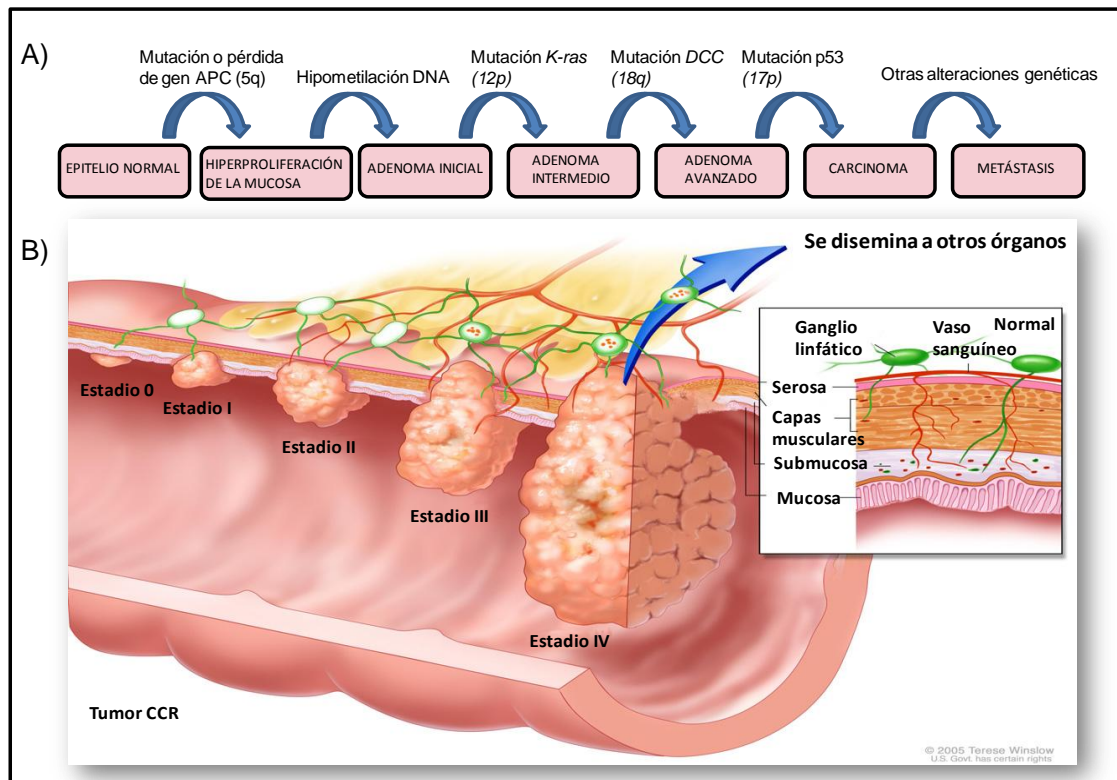


Figura 1. Bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal en función de las distintas etapas histológicas. A) Adaptación del modelo genético de Vogelstein donde se reflejan las alteraciones genéticas más comunes. La acumulación gradual de estas alteraciones origina finalmente la metástasis. B) Estadios del CCR según la clasificación TNM de la AJCC y UICC. Adaptación de <http://teresewinslow.com>.

Aproximadamente, el 85% de los casos de cáncer hereditario son debidos a cambios genéticos que dan lugar a inestabilidad cromosómica y el 15% restante es debido a inestabilidad de microsatélites (MSI, errores en los sistemas de reparación) (Kinzler and Vogelstein, 1998; Lindblom, 2001). La inestabilidad de microsatélites se caracteriza por mutaciones en los sistemas reparadores del ADN (hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1 y hPMS2) que predisponen a las células al desarrollo de mutaciones en una serie de secuencias repetitivas no codificantes del genoma (Peltomaki and Vasen, 2004). Estas mutaciones se dan en el 20% de los tumores esporádicos y en el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Gryfe et al., 2000). Los tumores en los que hay cambios en el balance cromosómico (aneuploidía) presentan frecuentemente pérdidas de heterocigosidad en múltiples *loci*, así como mutaciones que activan oncogenes e inactivan o bloquean genes supresores de tumores. En el caso del CCR es frecuente encontrar mutaciones en oncogenes como *K-RAS* y genes supresores de tumores como *APC* (5q), *DCC/SMAD2/SMAD4* (18q) y *TP53* (17p) (Vogelstein and Kinzler, 1993). Alteraciones de

este tipo afectan a más del 80% de los tumores esporádicos y los tumores asociados a poliposis adenomatosa familiar (Galiatsatos and Foulkes, 2006).

Genes tan importantes como el oncogén *K-RAS* nos proporcionan información de pronóstico sobre la agresividad, capacidad de recaída y metástasis (Andreyev et al., 1998), que se puede completar con el análisis de la inestabilidad alélica en determinados cromosomas como el 8p y el 18q y también con la determinación de los niveles de expresión de la enzima timidilato sintasa (TS) (Salonga et al., 2000; Popat et al., 2004; Popat and Houlston, 2005). Respecto al tratamiento, es importante realizar el análisis de la expresión de genes implicados en los mecanismos de reparación del ADN, como *ERCC1* y el conocimiento de determinados polimorfismos genéticos tales como *TS*, *UGT1A1*, *XRCC1*, que van a determinar la sensibilidad o resistencia a determinados fármacos (Ando et al., 2000; Stoecklacher et al., 2001; Edler et al., 2002).

2.2.2 Tratamiento de cáncer colorrectal

Actualmente, la cirugía es el principal tratamiento utilizado contra el cáncer de colon en las etapas iniciales en la que se extirpa el tumor, una porción normal del colon a ambos lados del mismo y también los ganglios linfáticos cercanos (Burt et al., 2010).

La quimioterapia puede administrarse después de la cirugía (quimioterapia adyuvante), o antes de la cirugía (neoadyuvante). La quimioterapia después de la cirugía se administra normalmente con el fin de erradicar las micrometástasis que quedan ocultas tras la cirugía y aumentar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.

El 5-Fluorouracilo (5-FU) continúa siendo el fármaco más utilizado en la quimioterapia para CCR y es utilizado en diversos tipos de cáncer incluyendo CCR, mama y cabeza y cuello, pero su eficacia en monoterapia presenta porcentajes de respuesta bajos (10-15%) (Douillard et al., 2003). La introducción en los años 90 de nuevos agentes antineoplásicos supuso un gran avance en el tratamiento del CCR demostrándose que la combinación de 5-FU y leucovorina como terapia adyuvante aumentaba el porcentaje de pacientes libres de enfermedad a los 5 años en estadio III. En la actualidad se administra como parte de cócteles en los cuales se utilizan varios fármacos antitumorales como gemcitabina, irinotecán y oxaliplatino, mejorándose la tasa de respuesta hasta un 40-50% (Giacchetti et al., 2000; Douillard et al., 2003; Diaz-Rubio, 2004). Entre las combinaciones

de fármacos quimioterápicos más frecuentes se encuentran: FOLFOX (5-FU, leucovorin y oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecán) o XELOX (capecitabina y oxaliplatino).

Cuando hay metástasis, normalmente se utilizan como primera línea de tratamiento las combinaciones anteriores (Goldberg et al., 2004) con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a dianas específicas.

Las nuevas terapias dirigidas que están surgiendo en el tratamiento de CCR mejoran la tasa de respuesta al tratamiento y aumentan la supervivencia. La terapia dirigida se basa en la identificación de dianas terapéuticas de las células tumorales, desarrollándose moléculas que permiten dirigir el tratamiento hacia las células tumorales de forma específica, causando menor toxicidad para las células no tumorales. Los recientes progresos en el estudio de las rutas donde intervienen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) han permitido el desarrollo de fármacos que actúan directamente sobre estas dianas.

En 2004, se aprobó para el tratamiento del cáncer colorrectal el uso de bevacizumab (Avastin), un anticuerpo monoclonal que interfiere con la síntesis de nuevos vasos sanguíneos en el tumor actuando sobre VEGF. Cuando bevacizumab se administra en combinación con 5-FU y leucovorina, se inhibe además el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, esto hace que el tumor no crezca ni se propague y desaparezca por falta de nutrición, incrementándose la media de supervivencia y reduciéndose el riesgo de mortalidad por CCR (Kabbinar et al., 2005).

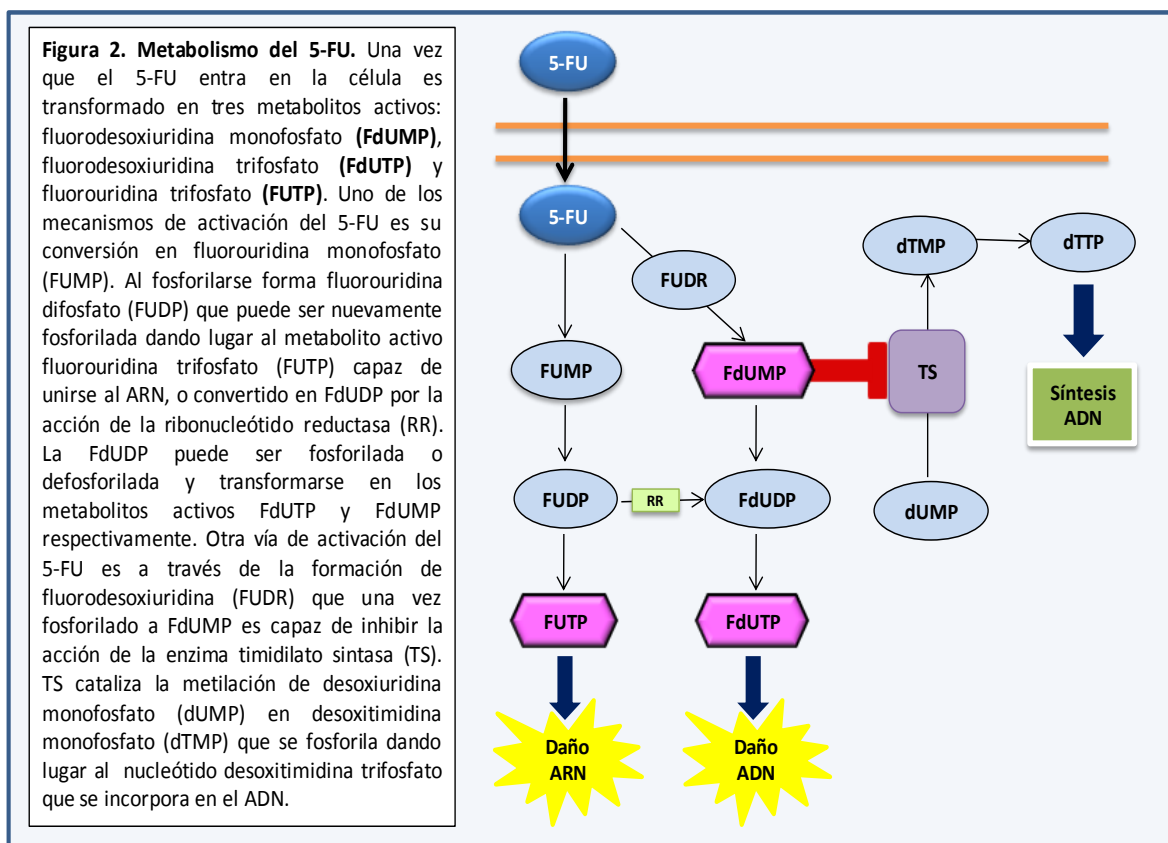
Cetuximab y panitumumab son anticuerpos monoclonales anti-EGFR, este receptor interacciona con vías de señalización que afectan al crecimiento celular y proliferación (Baselga, 2002). En CCR se ha visto que más del 80% de los pacientes expresan el receptor en la superficie celular y está relacionado con peor pronóstico. Estos fármacos han demostrado aumento del intervalo libre de enfermedad y en las tasas de supervivencia (Jonker et al., 2007; Van Cutsem et al., 2007).

Los pacientes con una mutación en *K-RAS* presentan peor respuesta y mayor resistencia al tratamiento con cetuximab (Lievre et al., 2008) o panitumumab (Amado et al., 2008). Esto y otras características moleculares ayudan a definir a aquellos pacientes a los que resultaría eficaz el tratamiento con inhibidores de EGFR, demostrando la importancia de la utilización de terapias dirigidas.

2.2.2.1 Mecanismo de acción del 5-FU

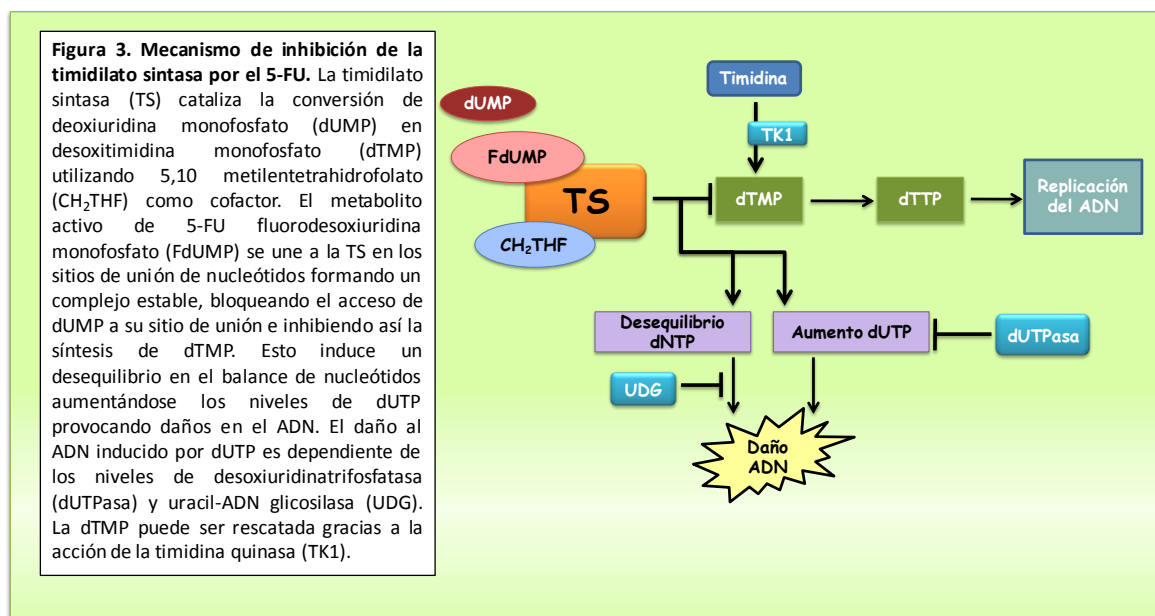
El 5-FU es una fluoropirimidina, sintetizada en los años 50 por el grupo de Heidelberger (Heidelberger et al., 1957), y ha sido el fármaco más estudiado en CCR. Pertenece a la familia de los antimetabolitos, que actúan inhibiendo procesos biosintéticos esenciales para la célula, o incorporándose en macromoléculas como ADN o ARN a los que afecta en su funcionalidad.

El 5-FU es un fármaco dual, por una parte, cuando entra en la célula es transformado en dos metabolitos activos, fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) y fluorouridina trifosfato (FUTP) capaces de incorporarse al ADN y ARN. El producto resultante de la incorporación errónea de las bases pirimidínicas de manera continuada lleva a la célula a la entrada en apoptosis. Sin embargo, la actividad del 5-FU radica fundamentalmente en la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS), esencial para la síntesis de timidilato (dTMP) (Longley et al., 2003).



La timidilato sintasa cataliza la metilación de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP o timidilato), una reacción que requiere folato como cofactor. La TS es fundamental para la síntesis *de novo* de timidilato, esencial para la síntesis y reparación del ADN (figura 2).

Cuando el 5-FU entra en la célula, es transformado en un análogo del nucleótido dUMP, llamado fluorodesoxiuridina monofosfato, (FdUMP). Este metabolito es capaz de unirse covalentemente al sitio activo de TS e inhibirla en presencia del cosubstrato, metilentetrahidrofolato (CH_2THF) (Carreras and Santi, 1995). Al unirse FdUMP y CH_2THF , se forma un complejo molecular estable que bloquea la unión del sustrato normal dUMP y por lo tanto queda inhibida la síntesis de dTMP (Longley et al., 2003). La falta de dTMP produce por una parte disminución del nucleótido desoxitimidina trifosfato (dTTP) y un aumento de dUMP que se traduce en una acumulación de desoxiuridina trifosfato (dUTP) que se intercala en el ADN de manera errónea, por lo que se produce una inhibición de la síntesis de ADN e inducción de apoptosis (figura 3). Las consecuencias bioquímicas que tienen lugar al inhibir la enzima se relacionan con efectos directos en la enzima, con la formación del complejo ternario (FdUMP-TS- CH_2THF) y su estabilización, acción que conlleva a la inducción de TS producida por la autorregulación de la traducción de su propio ARNm y efectos cascada abajo de la inhibición, como daño y ruptura de las hebras de ADN seguido de la inducción de muerte celular.



Diversos estudios han demostrado que los niveles de TS están elevados en tejidos tumorales con respecto al tejido normal (Rahman et al., 2004). Una elevada expresión intratumoral de la TS ha sido descrita como un factor de mal pronóstico en pacientes con carcinoma colorrectal avanzado (Nomura et al., 2002; Johnston et al., 2003; Mizutani et al., 2003).

Puesto que TS tiene una función muy importante en la síntesis de dTMP y de ADN y su inhibición resulta en una disminución de la proliferación celular, TS representa una diana importante en el tratamiento del cáncer. De hecho, se han sintetizado diversos fármacos que bloquean su actividad. En la actualidad existen dos tipos de inhibidores de la TS:

1) Inhibidores de nucleósidos clásicos o análogos de las pirimidinas. La mayoría son pro-fármacos de FdUMP que se unen al lugar específico de dUMP en la TS. En este grupo se encuentran el 5-FU, la capecitabina que es la forma oral del 5-FU, el Ftorafur que es una combinación de tegafur (proforma oral del 5-FU) y el uracilo. Este último se utiliza como inhibidor competitivo de la degradación del 5-FU a través de la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa que es la responsable del catabolismo del 5-FU en un metabolito inactivo, dihidrofluorouracilo (DHFU).

2) Análogos de folatos. Son estructuras análogas a los dihidrofolatos y se unen al sitio de unión del CH₂THF de la enzima. En este grupo se encuentran fármacos como el Raltitrexed o Pemetrexed, que son transportados al interior de la célula por el transportador de folatos reducidos. Una vez allí son poliglutamados por la enzima folilpoliglutamato sintasa (FPGS), permanecen más tiempo en el interior de la célula e inhiben la enzima aumentando así, la actividad antitumoral.

Además, TS regula la expresión de su propio mensajero y la de otros genes como p53 (Schmitz et al., 2001). Se ha visto que al tratar con 5-FU se produce un aumento de la proteína debido a la estabilización de la enzima como consecuencia de cambios en la estructura al formarse el complejo ternario. Esto impide la unión con su ARNm y de esta forma se induce la traducción de la proteína (Peters et al., 2002).

2.2.3 Resistencia al tratamiento

La resistencia a los agentes quimioterápicos es uno de los principales problemas en la eficacia del tratamiento contra el cáncer. Está producida por diversos mecanismos como puede ser un incremento en la inactivación del fármaco, el descenso en la acumulación del fármaco, aumento de su expulsión por la célula, mejora de los mecanismos de reparación del daño producido en la célula tumoral por el fármaco e inactivación de las rutas de apoptosis (Hersey et al., 2008). Se han descrito dos tipos de resistencia, la intrínseca o inherente que es la que tienen las células tumorales antes del inicio del tratamiento y la adquirida, en la que son activados distintos mecanismos de resistencia después de la exposición al fármaco. La identificación de los mecanismos responsables de la generación de estas resistencias, es muy importante para el diseño y desarrollo de nuevas estrategias de tratamientos antitumorales basados en la identificación de nuevas dianas terapéuticas. El diseño de estrategias tiene como objetivo interferir con los componentes moleculares que confieren la resistencia al tratamiento, y constituye un paso fundamental para aumentar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos.

La resistencia al tratamiento con 5-FU está principalmente asociada al aumento de los niveles de la timidilato sintasa (TS), por lo que la disminución de sus niveles de expresión es importante, ya que se mejoraría la sensibilidad a fármacos inhibidores de la TS, como el 5-FU o el raltitrexed (Schmitz et al., 2004; Xi et al., 2006). También, se han asociado con resistencia a 5-FU mutaciones en el gen de la TS que producen una disminución de su afinidad por FdUMP (Kitchens et al., 1999) y polimorfismos en la zona promotora del gen de TS que determinan la respuesta a los fármacos que actúan inhibiendo TS (Horie et al., 1995). Sin embargo, la acción del 5-FU sobre la TS puede ser recuperada por la timidina quinasa (TK1). Esta ruta alternativa representa uno de los mecanismos más importantes de resistencia al 5-FU (Grem and Fischer, 1989).

Otro factor que afecta a la resistencia al 5-FU es el aumento de la actividad de la desoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa) (Ladner et al., 2000). Esta enzima cataliza la hidrólisis de dUTP en dUMP. Aunque dUTP es un intermediario de la síntesis de ADN, su acumulación e incorporación errónea en el ADN es letal para las células, por eso la función de dUTPasa es importante en cuanto que se encarga de mantener el balance de los niveles de dUTP/dUMP.

2.3 **Cáncer de pulmón**

La neoplasia de pulmón es la forma más frecuente de cáncer en términos de incidencia y de mortalidad, provocando aproximadamente 1,38 millones de muertes en el mundo cada año, con tasas más elevadas en varios países de Europa y Norteamérica (Globocan, 2008). El número de casos crece cada año y se prevé un aumento en los países en vías de desarrollo. En Europa en 2008 se diagnosticaron 390.900 casos y fue responsable de 342.100 muertes. En España, este mismo año se diagnosticaron 23.510 nuevos casos y hubo una mortalidad de 20.590 pacientes (Ferlay et al., 2010).

El cáncer de pulmón se clasifica fundamentalmente en dos tipos:

a) Cáncer de pulmón de célula pequeña o microcítico (CPM): comprende el 15-20% de todas las neoplasias pulmonares.

b) Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) se corresponde con el 80-85% restante. Se diferencian tres subgrupos:

1) Adenocarcinoma: es el subtipo histológico más frecuente (35-40%). Es un tumor epitelial maligno con diferenciación glandular y se caracteriza por su producción de mucina y su localización en la periferia del pulmón. Presenta varios patrones de crecimiento: acinar, papilar y bronquioalveolar.

2) Carcinoma epidermoide: Es un tumor epitelial maligno que tiene características de diferenciación escamosa. Tiende a extenderse *in situ* a lo largo de la mucosa bronquial y a ser localmente agresivo y las metástasis son mucho menos frecuentes que en los otros tipos (Quint et al., 1996).

3) Carcinoma de célula grande: tumor pobremente diferenciado que se diagnostica por exclusión. Está formado por nidos de células poligonales grandes, con núcleo vesicular, nucléolo prominente y bordes bien definidos.

El sistema utilizado internacionalmente para clasificar el cáncer de pulmón es el TNM, que considera la clasificación por fases o estadios clínicos y por estadios patológico-quirúrgicos. La clasificación más reciente adoptada por las sociedades internacionales se corresponde con la descrita por la UICC, 7ª Edición (Trigo Perez et al., 2010).

Tumor primario					
Tx	Presencia de células malignas en secreciones bronquiales. El tumor no se visualiza por RX en la broncoscopia o no se puede evaluar.				
T0	No hay evidencia del tumor primario.				
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .				
T1	Diámetro máximo del tumor ≤ 3cm, rodeado de pulmón o pleura visceral y sin que la broncoscopia muestre evidencia de invasión proximal de un bronquio lobular.				
T2	Diámetro máximo del tumor > 3cm o tumor de cualquier tamaño que invade la pleura visceral o tiene asociada una atelectasia obstructiva que llega hasta el hilio sin afectar al pulmón entero.				
T3	Tumor de cualquier tamaño con invasión de la pared torácica, diafragma, pleura mediastínica o pericardio y que no afecte al corazón, grandes vasos, tráquea, esófago o cuerpo vertebral o tumor en bronquio principal a menos de 2cm de la carina. Atelectasia o neumonitis obstructiva que afecte a todo el pulmón.				
T4	Tumor de cualquier tamaño con invasión del mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago.				
Afectación ganglionar					
N0	No metástasis en los ganglios regionales.				
N1	Metástasis en los ganglios peribronquiales y/o hilares ipsilaterales.				
N2	Metástasis en los ganglios mediastínicos y subcarinales ipsilaterales.				
N3	Metástasis en los ganglios mediastínicos o hilares contralaterales o invasión en ganglios escalenos y supraclaviculares tanto ipsilaterales como contralaterales.				
Metástasis a distancia					
M0	No hay metástasis a distancia.				
M1	Metástasis a distancia.				
Agrupamiento en estadios de los subgrupos TNM					
Carcinoma oculto	Estadio 0	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
TxN ₀ M ₀	TisN0M0	IA T1N0M0 IB T2N0M0	IIA T1N1M0 IIB T2N1M0, T3N0M0	IIIA T1-2N2M0 T3N1-2M0, IIIB Cualquier T N3M0 T4 cualquier N M0	Cualquier T cualquier N M1

Tabla 2. Clasificación TNM del cáncer de pulmón no microcítico según la UICC

2.3.1 Biología molecular del cáncer de pulmón

Se han descrito oncogenes y genes supresores de tumores relacionados con el desarrollo del cáncer de pulmón.

Oncogenes: receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*). Cuando interaccionan el EGF con el receptor, la tirosinquinasa localizada en el dominio intracelular del receptor es activada, produciéndose la autofosforilación del receptor, que desencadena una cascada de señales que incluyen a las proteínas quinasas mitógeno-activadas (MAPK) de las que hablaremos más adelante. Se ha encontrado que el receptor EGFR está sobreexpresado en un 40-80% de los casos de cáncer de pulmón. Además, se han descrito mutaciones en el dominio tirosinquinasa que tienen como consecuencia la activación constitutiva del receptor y actúa de forma independiente de la unión del ligando activando de manera continuada las rutas de señalización intracelular. Estas mutaciones se han relacionado con la respuesta a los fármacos inhibidores de tirosina quinasa (De Castro-Carpeno, 2010).

La familia de oncogenes *KRAS*, *HRAS* y *NRAS* codifica proteínas que están implicadas en procesos de señalización celular en los que se incluye la mitogénesis. La unión de RAS a GTP mantiene la proteína activa. *RAS* se convierte en un oncogén cuando por cambios en un aminoácido pierde la capacidad para hidrolizar GTP o aumenta su tasa de intercambio de GDP por GTP, y la proteína permanece activa. Los carcinomas de pulmón tienen un patrón de mutaciones de *K-RAS* influenciado por los carcinógenos relacionados con el consumo del tabaco.

Genes supresores de tumores: *P53*. La proteína p53 interviene en el control del ciclo celular y la reparación del ADN, mantiene la estabilidad genómica, activa la apoptosis y participa en la respuesta celular frente a agentes externos nocivos. La inactivación de p53 ocurre en el 60% de los CPNM, las mutaciones que causan su inactivación (sustitución de una G por una T) son debidas principalmente al consumo de tabaco. Otro gen supresor de tumores es *RB*, las mutaciones en este gen aparecen en un 15% de los casos de CPNM.

2.3.2 Tratamiento de cáncer de pulmón

El tratamiento del cáncer de pulmón depende de varios factores como el tipo de cáncer de pulmón (de células pequeñas o no pequeñas), el tamaño, sitio y extensión del tumor, y de la salud general del paciente. En general, existen muchos tratamientos diferentes como la cirugía, quimioterapia y la radioterapia o combinaciones de éstas para controlar el cáncer de pulmón o para mejorar la calidad de vida, al reducir los síntomas. En estadios tempranos como I y II en los que la enfermedad se encuentra localizada, se recomienda la resección quirúrgica del tumor. Si la cirugía está contraindicada para el paciente, el tratamiento que se considera es la radioterapia. A continuación se evaluaría la necesidad de administrar un tratamiento quimioterápico adyuvante. En estadio III se utilizan combinaciones de quimioterapia, radioterapia y cirugía en el caso que sea posible. En caso de enfermedad avanzada (estadio IV), se recomienda un tratamiento basado en diferentes asociaciones de platino (cis o carbo) en combinación con docetaxel, gemcitabina, paclitaxel, pemetrexed o vinorelbina. Si el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se encuentra mutado se administra al paciente gefitinib como tratamiento de primera línea. Si no se encuentra mutado o se desconoce, es preferible el tratamiento con fármacos citotóxicos (Trigo Perez et al., 2010).

El tratamiento quimioterápico del CPNM comenzó en la década de 1970, con esquemas que contenían adriamicina y ciclofosfamida, pero la respuesta al igual que la supervivencia era escasa. En la actualidad, aunque existe una gran variedad de quimioterápicos que tienen actividad frente al CPNM, los más activos son los derivados del platino, cisplatino y carboplatino. Diversos estudios han demostrado que la eficacia de la quimioterapia mejora cuando se utilizan los fármacos derivados del platino en combinación con otros agentes antitumorales.

El cisplatino es una molécula que pertenece al grupo de alquilantes del ADN, además de en CPNM se utiliza como tratamiento de otros tipos de cáncer incluido el cáncer de ovario, testicular y de cérvix (Jamieson and Lippard, 1999). El mecanismo de acción del cisplatino consiste en la formación de enlaces covalentes entre el átomo de nitrógeno 7 de las bases púricas y el átomo de platino formándose enlaces cruzados 1,2 ó 1,3 entre las cadenas del ADN, de esta forma se pierde la estabilidad de la doble hélice y la célula entra en apoptosis. Sin embargo, la utilización de esta molécula está limitada por los efectos adversos que provoca, como son nefrotoxicidad, emetogénesis y neurotoxicidad, los dos primeros se pueden corregir con diuréticos y fármacos inhibidores del receptor de la serotonina (Wong and Giandomenico, 1999). La neurotoxicidad es un efecto tóxico dosis-dependiente. Además de su toxicidad, otra limitación en su uso es la resistencia, inherente y/o adquirida.

En el caso del cisplatino, los mecanismos de resistencia más importantes son inactivación del cisplatino por glutatión, metalotioninas y otras moléculas que contienen azufre, y reparación de los puentes formados entre el cisplatino y ADN (Eastman, 1987; Kasahara et al., 1991).

2.4 Colina quinasa como diana terapéutica

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la biología molecular del cáncer con resultados positivos en terapias dirigidas según las características moleculares de cada tumor. Esta área es fundamental, ya que permite el desarrollo de nuevas terapias adaptadas a cada paciente con el fin de administrarles el tratamiento que resulte más beneficioso. Por esto, el estudio de nuevas dianas así como la síntesis de fármacos que actúen contra éstas se ha convertido en un reto, con el fin de ofrecer el tratamiento que resulte más eficaz ofreciendo terapias específicas para cada tipo de tumor.

La enzima colina quinasa ChoK α es responsable de la síntesis de fosfocolina (PCho) a partir de colina, un componente esencial de la dieta (Lacal, 2001). La PCho es el primer eslabón de la ruta de Kennedy o de la síntesis de la fosfatidilcolina (PC), uno de los componentes mayoritarios de las membranas celulares (Figura 4). En mamíferos se conocen tres isoformas diferentes de ChoK (Chk- α 1, Chk- α 2 y Chk- β) que están codificadas por dos genes (*CHKA* Y *CHKB*) (Aoyama et al., 2004). No existe un consenso sobre la nomenclatura del gen que codifica la colina quinasa (CHKA, CHK y CK1), siendo todos aceptados y usados arbitrariamente en la literatura (Casado-Vela et al., 2011). La presencia de las isoformas ChoK α y ChoK β sugiere una mayor complejidad en los procesos de regulación de su actividad enzimática (Aoyama et al., 2004). Mientras que la sobreexpresión de ChoK α es oncogénica, la de ChoK β no lo es (Gallego-Ortega et al., 2009). La primera evidencia de la posible función de ChoK α y su producto, PCho, en la transformación oncogénica vino dada por la demostración de que células transformadas por el oncogén *RAS* mostraban niveles elevados de PCho y que eran consecuencia de la activación de ChoK α (Lacal et al., 1987; Macara, 1989; Lacal, 1990; Bhakoo et al., 1996). Más tarde se demostró que el aumento de PCho era debido a un aumento de la actividad ChoK α (Ramírez de Molina et al., 2001), regulado por dos de los efectores del oncogén *RAS*, PI3K y Ral-GDS (Ramírez de Molina et al., 2002b). Otros oncogenes, como *SRC*, *RAF*, *MOS*, *RhoA* también inducen la activación de ChoK α en condiciones de malignidad (Teegarden et al., 1990; Ratnam and Kent, 1995; Hernandez-Alcoceba et al., 1997; Ramírez de Molina et al., 2005).

Un aumento de los niveles de ChoK α ha sido demostrado en diferentes líneas celulares procedentes de tumores humanos, así como en tejidos tumorales humanos de colon, pulmón, próstata, ovario, vejiga y mama con respecto a sus correspondientes tejidos normales (Nakagami et al., 1999b; Ramirez de Molina et al., 2001; Ramirez de Molina et al., 2002a; Ramirez de Molina et al., 2002c; Ramirez de Molina et al., 2004; Iorio et al., 2005; Hernando et al., 2009; Iorio et al., 2010). Como resultado, se ha descrito que el incremento de los niveles basales de PCho es una característica común en líneas derivadas de tumores humanos, así como en sistemas de inducción de tumores por carcinógenos químicos (Ishidate et al., 1980; Nakagami et al., 1999a; Aoyama et al., 2007). Por último, un estudio elaborado con 167 muestras de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, demostró la utilidad de ChoK α como marcador tumoral, revelando que la sobreexpresión del ARNm de esta enzima está asociada a una menor supervivencia y peor pronóstico de la enfermedad, lo que podría tener importantes consecuencias clínicas (Ramirez de Molina et al., 2007).

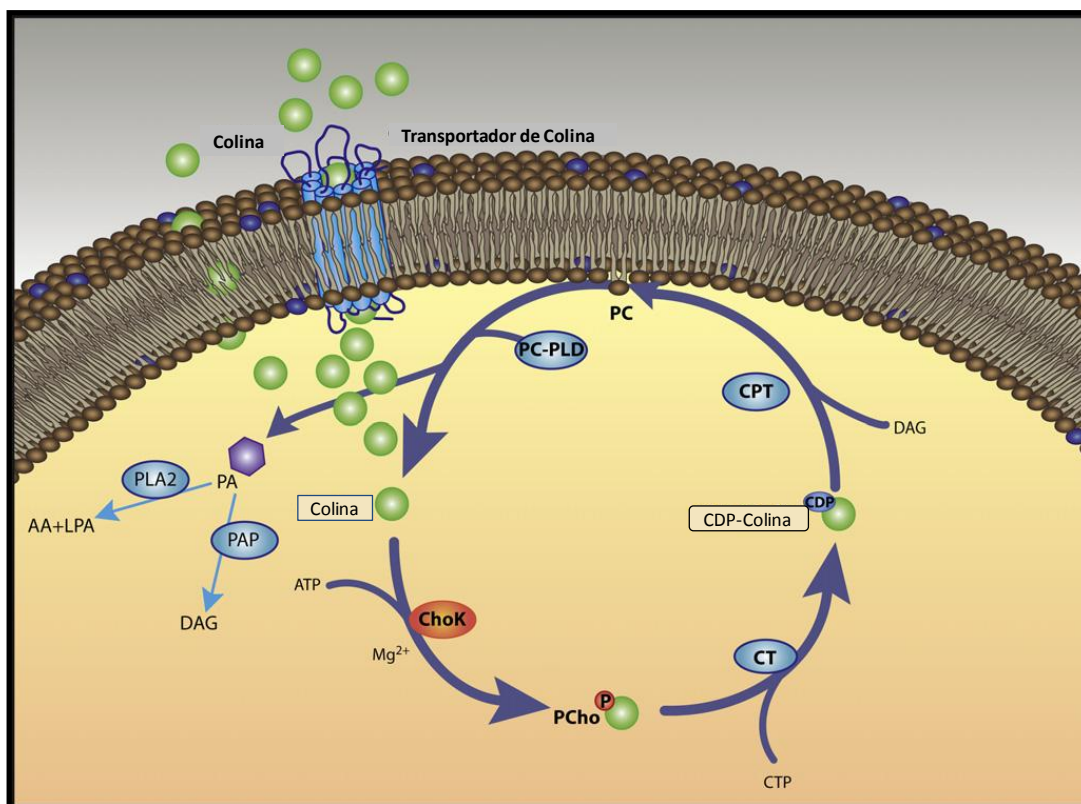


Figura 4. Esquema del Ciclo de Kennedy. La colina entra en el interior de la célula por difusión pasiva o mediante transportadores específicos. A continuación, es fosforilada por la colina quinasa (ChoK) a fosfocolina (PCho), constituyendo el primer paso de la ruta de Kennedy. Mediante la acción de la citidiltransferasa (CT), PCho es transformada en CDP-Colina, que debido a la acción de la DAG-colina fosfotransferasa (CPT) genera fosfatidilcolina (PC). La fosfolipasa D específica de PC (PC-PLD) hidroliza PC para volver a generar Cho y así cerrar el ciclo, y ácido fosfatídico (PA) que será transformado en ácido araquidónico (AA) y ácido lisofosfatídico (LPA) por la fosfolipasa A2 (PLA2) o a diacilglicerol (DAG) por la acción de la fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP). Adaptado de (Gallego-Ortega et al., 2011)

La relevancia de ChoK α en carcinogénesis ha derivado en el desarrollo de una nueva estrategia antitumoral basada en la inhibición específica de esta enzima (Lacal, 2001). Inicialmente se describió la posibilidad de interferir la actividad de ChoK α utilizando análogos de la colina (Wittenberg and Kornberg, 1953), pero la mayoría de las moléculas presentaban inespecificidad o no resultaban ser inhibidores eficientes. Entre estas moléculas destacaba el Hemicolinio-3 (HC-3) como mejor inhibidor de ChoK α , aunque inespecífico, y con efecto inhibitorio sobre el transportador de colina de alta afinidad, provocando gran toxicidad sobre los terminales nerviosos colinérgicos que lo convierte en un potente paralizante respiratorio y por tanto un compuesto letal impidiendo su uso *in vivo* (Lloveras et al., 1985; Cannon, 1994). Sin embargo, el HC-3 ha servido como base en la generación de nuevos compuestos inhibidores de ChoK α más efectivos y menos tóxicos (Campos et al., 2001). Siguiendo esta aproximación, nuestro grupo puso en marcha un sistema de desarrollo de una nueva serie de compuestos inhibidores de ChoK α , entre los que destaca MN58b (Hernandez-Alcoceba et al., 1997; Hernandez-Alcoceba et al., 1999) con el que se confirmó la eficacia de ChoK α como diana terapéutica obteniendo resultados significativos, tanto en lo que respecta a su actividad antiproliferativa *in vitro*, como a su efecto antitumoral *in vivo*. Estos resultados han hecho que este fármaco se haya colocado como cabeza de serie para el estudio de su mecanismo de acción.

El MN58b es un fármaco específico de ChoK α , que no afecta a otras enzimas cercanas en la ruta de Kennedy como la fosfolipasa D (PLD) o la citidiltransferasa (CT). Pero además, también es específico de células tumorales, ya que mientras que las células primarias sufren una parada reversible del ciclo celular en G1 siendo capaces de recuperar la cinética de crecimiento una vez retirado el fármaco, las células tumorales resultan insensibles a las señales de parada de ciclo y son irreversiblemente dirigidas a apoptosis al producirse un incremento de los niveles de ceramidas tras el tratamiento (Rodriguez-Gonzalez et al., 2004; Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). Se ha demostrado también que, tanto la inhibición química de ChoK α a través de MN58b como su inhibición mediante un ARN de interferencia, reducen la fosforilación de Akt en la posición Ser 473 pero no la de Thr 308, independientemente de PI3K (Chua et al., 2009). Yalcin et al., han mostrado resultados similares, en los que exponen que la inhibición selectiva de ChoK α utilizando un ARN de interferencia o una molécula antagonista de ChoK α , son capaces de

atenuar las rutas de señalización MAPK y PI3K como consecuencia de la disminución de PC por lo que sugieren que PC además de ser un lípido de membrana tiene un papel importante en la activación de cascadas de señalización intracelular (Yalcin et al., 2010; Clem et al., 2011).

Los resultados obtenidos con MN58b sirvieron de base para el desarrollo de una segunda generación de inhibidores de ChoK α , en los que se ha conseguido potenciar el efecto antitumoral disminuyendo la toxicidad.

Los inhibidores de ChoK α constituyen una nueva estrategia antitumoral susceptible de ser utilizada en regímenes de quimioterapia combinatoria con fármacos ya desarrollados y cuyos mecanismos de acción sean diferentes.

OBJETIVOS

3 Objetivos

La mayoría de los tratamientos antitumorales consisten en la combinación de varios fármacos para potenciar los efectos y reducir su toxicidad. Nuestro objetivo fundamental ha sido el estudio del efecto de la combinación de inhibidores de ChoK α con los fármacos utilizados actualmente en primera línea en la quimioterapia del cáncer de colon y de pulmón. Los objetivos específicos de nuestro programa fueron:

- Estudio del efecto de la combinación de inhibidores de ChoK α (MN58b y RSM932A) con 5-FU en cáncer colorrectal y del mecanismo de acción subyacente al posible sinergismo de esta combinación.
- Estudio del efecto de la combinación de inhibidores de ChoK α (MN58b y RSM932A) con cisplatino en cáncer de pulmón no microcítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

4 Materiales y métodos

4.1 Fármacos

Los inhibidores específicos de la colina quinasa, MN58b y RSM932A fueron proporcionados por el Departamento de Química Médica de la Universidad de Granada. El MN58b se solubilizó en agua y el RSM932A en DMSO: H₂O (v/v, 2:1). El 5-FU fue adquirido a Sigma Chemical Co (F6627) y reconstituido en PBS. El Cisplatino fue un obsequio de la compañía farmacéutica Ferrer Farma (C.N.657932.9) se encontraba a una concentración de 0,5 mg/ml en cloruro sódico, ácido clorhídrico diluido y agua. Las soluciones stock del resto de los fármacos se prepararon a una concentración de 5 mM.

4.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas en el modelo de cáncer colorrectal derivan de adenocarcinomas colorrectales humanos: SW620 (CCL-227), HT29 (HTB-38) y DLD-1 (CCL-221). Como línea no tumoral de colon se utilizó CCD-481 (CRL-1790). Las líneas celulares utilizadas en el modelo de cáncer de pulmón no microcítico fueron H460 (HTB-177) originada a partir de un derrame pleural de un carcinoma pulmonar y H1299 (CRL-5803) derivada de un nódulo linfático de un carcinoma de pulmón no microcítico. Todas las líneas proceden de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas VA, USA). Las líneas SW620 y HT29 fueron mantenidas en DMEM (Medio *Eagle* modificado por Dubelcco) (GIBCO) y DLD-1, H460 y H1299 en RPMI1640 (Instituto Memorial *Roswell Park*) (GIBCO). CCD-841 fue mantenida en MEM (Medio Mínimo Esencial de *Eagle*) Los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino al 10% FBS, (Life Technologies, Grand Island, NY), 2mM de glutamina, 1% de fungizona y 100U/ml de amikacina (GIBCO). Las líneas celulares fueron mantenidas en condiciones estándar de cultivo: 95% de humedad, 37°C de temperatura y 5% de CO₂.

4.3 Análisis de viabilidad celular

Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 6.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (BD, Falcon, Bioscience, San Jose, CA, USA), y fueron mantenidas durante 24h en condiciones estándar. A continuación las células se trataron con diferentes concentraciones de fármacos según las pautas expuestas en el siguiente apartado de ensayos de combinación.

Para el análisis de viabilidad celular se utilizaron dos métodos: MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) y violeta cristal.

El MTT se preparó en disolución a una concentración de 5 mg/ml y se añadieron 20 μ l a cada pocillo de placa de 96 pocillos en un volumen de 200 μ l. La placa se mantuvo en el incubador durante 3 horas, después se aspiró el medio y se añadieron 200 μ l de DMSO. La absorbancia fue determinada en el VersaMax Microplate Reader a 560 nm.

El violeta cristal tiñe las proteínas del núcleo. Las células se fijaron con glutaraldehído (1%) durante 30 minutos, se tiñeron con una solución de violeta cristal al 0,1%, se lavaron 3 veces con agua destilada y se dejaron secar al aire. Cuando los pocillos estaban secos el colorante fue extraído con 300 μ l (volumen para placas de 24 pocillos) de una solución de ácido acético al 10% y se midió la absorbancia a 595 nm en el VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

La IC₅₀, concentración necesaria de fármaco para producir el 50% de inhibición de crecimiento celular *in vitro*, se determinó construyendo una curva dosis respuesta con concentraciones crecientes de fármaco en un rango de 0,5 a 30 μ M.

4.4 Ensayos de combinación

En los ensayos realizados en las líneas tumorales de colon se utilizó el 5-FU como fármaco quimioterápico tradicional y en las líneas de CPNM se utilizó cisplatino. En ambos casos estos fármacos fueron combinados con los inhibidores de ChoK α . Las líneas utilizadas en CCR fueron SW620, HT29 y DLD-1. En CPNM se utilizaron las líneas tumorales H460 y H1299.

Las líneas celulares tanto de colon como de pulmón, fueron sembradas en placas de 96 pocillos (BD, Falcon Bioscience, San Jose, CA, USA) con una densidad de 6.000

células por pocillo e incubadas en condiciones estándar durante 24 horas. A continuación las células fueron mantenidas en presencia de los distintos fármacos con diferentes pautas de tratamiento: concomitante y secuencial. Se utilizaron distintas combinaciones para identificar la mejor pauta de tratamiento. El tratamiento concomitante consistió en el mantenimiento de las células en presencia de los dos fármacos durante el mismo tiempo. El tratamiento secuencial consistió en añadir a las células uno de los fármacos durante un tiempo determinado, y una vez retirado el primer fármaco, añadir el segundo. Se ensayaron distintas combinaciones de fármaco. Las concentraciones se fijaron teniendo en cuenta la IC₅₀ calculada para cada una de las líneas.

Las pautas con las que se obtuvo mejor efecto fueron: en cáncer colorrectal RSM932A 24h y a continuación se retiró el medio y se sustituyó por medio con 5-FU 24h. MN58b 9h y a continuación se retiró el medio y se sustituyó por medio con 5-FU 60h. En CPNM se trató con cisplatino entre 3 y 5h, a continuación se retiró el medio y se sustituyó por medio con los inhibidores de ChoK α 40h.

4.5 Generación de líneas celulares resistentes a fármacos

4.5.1 Líneas celulares H460 resistentes a MN58b y RSM932A

Las líneas celulares resistentes a MN58b y RSM932A fueron generadas a partir de H460 mantenidas en RPMI en condiciones estándar de temperatura (37°C), humedad (95%) y dióxido de carbono (5%). La resistencia a los inhibidores de ChoK α la adquirieron por exposición continua a concentraciones crecientes del fármaco durante 9 meses hasta alcanzar una dosis de 0,4 μ M para MN58b y 8 μ M para RSM932A.

4.6 Evaluación del efecto antiproliferativo al combinar los fármacos

Los resultados de los ensayos de combinación para determinar sinergia, adición o antagonismo fueron analizados utilizando el índice de combinación (CI, combination index) de Chou & Talalay (Chou and Talalay, 1984). La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\text{Índice de combinación, CI} = (D1/(D_f)_1 + D2/(D_f)_2 + \alpha D1D2/(D_f)_1(D_f)_2)$$

D1 y D2: concentraciones de cada uno de los fármacos en combinatoria que dan lugar a una supervivencia f determinada.

(D $_f$) $_1$ y (D $_f$) $_2$: concentraciones de los fármacos como agentes únicos que dan lugar a la misma supervivencia f .

α : 0 o 1 según los mecanismos de acción de los fármacos, si son excluyentes o no.

Los rangos de $CI < 1$ indican interacciones sinérgicas entre los dos agentes, interacciones aditivas están indicadas por $CI = 1$ y cuando $CI > 1$ indica antagonismo entre ellos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa Calcsyn (Biosoft, Oxford, UK).

4.7 Ensayos de actividad antitumoral *in vivo*

Todos los experimentos realizados *in vivo* con el modelo experimental de ratones inmunodeprimidos fueron realizados después de la aprobación del correspondiente protocolo por el comité ético del centro.

Se utilizaron ratones hembra inmunodeprimidos de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories) mantenidos a una temperatura de 25°C, fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad y con comida y agua *ad libitum*.

En el estudio de colon, la línea tumoral DLD-1 fue inoculada por vía subcutánea (10^6 células/0,1ml) en 28 ratones inmunodeprimidos. Las células se mezclaron con matrigel (354234, BD Bioscience) en proporción 1:1 con el fin de obtener tumores lo más homogéneos posibles. El tamaño tumoral se controló utilizando calibres milimétricos determinando el volumen tumoral aplicando la fórmula: volumen tumoral = $(a \times b^2)/2$ donde “a” es el diámetro mayor y “b” el diámetro menor (Euhus et al., 1986).

Cuando el tamaño alcanzó aproximadamente $0,2 \text{ cm}^3$ se separaron los ratones en 4 grupos, a los que se aplicaron los tratamientos seleccionando las diferentes pautas:

- Grupo 1: grupo control.
- Grupo 2: MN58b 2 mg/kg.
- Grupo 3: 5-FU 40 mg/kg.
- Grupo 4: MN58b 3 días a la semana y 5-FU 2 días a la semana.

El experimento duró 3 semanas y fue repetido con un protocolo igual con RSM932A en DLD-1 y en SW620. Los fármacos MN58b y 5-FU se disolvieron en PBS y el RSM932A se disolvió primero en DMSO: H₂O (v/v 2:1) y a continuación se diluyó en PBS hasta la concentración apropiada. Los fármacos fueron administrados mediante inyección intraperitoneal.

En el estudio de pulmón se utilizó la línea H460 y los fármacos fueron el cisplatino y los inhibidores de ChoK α . El protocolo del experimento es como el del modelo de líneas tumorales de colon pero los grupos en las xenografías de ratón fueron:

- Grupo 1: grupo control.
- Grupo 2: MN58b o RSM932A, 2 mg/kg.
- Grupo 3: Cisplatino 1mg/kg.
- Grupo 4: Cisplatino 1mg/kg 1ª semana y MN58b 2mg/kg 2ª semanas.
- Grupo 5: MN58b 3 días a la semana y cisplatino 2 días a la semana.

En las secciones correspondientes de los resultados se exponen de manera más detallada las pautas de tratamiento.

4.8 Muestras de pacientes

En este estudio se utilizaron muestras de tejido tumoral congelado procedente de 84 pacientes con CPNM procedentes del departamento de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Los criterios de inclusión fueron: 18 años de edad mínima, puntuación general del paciente que según el Grupo Oncológico Cooperativo del Este (ECOG) se escogieron los de puntuación de 0 o 1, extracción total del tumor quirúrgicamente, durante la operación se hizo una disección del nódulo de mediastino para asegurar el estadio, o biopsia del nódulo de acuerdo con el criterio de cirugía establecido por el hospital. Si los pacientes cumplían estos criterios de inclusión y la calidad de la muestra congelada era suficientemente buena, se consideraban adecuados para el análisis. A todos los pacientes evaluados se les realizó un escáner CT durante el periodo de la operación que confirmaba que el tumor estaba localizado. Los criterios de exclusión fueron: afectación de los nódulos traqueo-bronquiales, mezcla de diferentes tipos histológicos y otros tipos de cáncer en los últimos 5 años. El seguimiento de los pacientes se hizo según el criterio establecido por el Departamento de Cirugía Torácica

del Hospital Universitario La Paz de Madrid que incluía la evolución clínica y la tomografía computerizada (TC) de tórax de los pacientes cada 3 meses durante 2 años y después cada 6 meses. Previamente se obtuvo la aprobación del comité ético del centro para la realización del estudio, así como el consentimiento informado de todos los pacientes.

4.9 Cultivos primarios de tumores de CPNM

Los tejidos procedentes de la resección quirúrgica de los pacientes fueron disociados con un kit de disociación de tejidos (Cell dissociation sieve-tissued grinder kit CD1, Sigma), y las células obtenidas fueron sembradas en placas de 24 pocillos (BD, Falcon Bioscience, San Jose, CA, USA). Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de 0, 0.5, 1, 5, 10 y 20 μ M de cisplatino (cDDP) y el inhibidor de ChoK α , MN58b durante 10 días en DMEM: F12HAM (Ref: D8437, Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, Life Technologies, Grand Island, NY). La población de células presentes en cada pocillo al final del experimento fue cuantificada por el método del violeta cristal.

4.10 Ensayos de citometría de flujo

La distribución del ciclo celular fue determinada mediante tinción del ADN con yoduro de propidio (IP). Las líneas utilizadas en este estudio fueron SW620 y DLD-1 en CCR y H460 y H1299 en CPNM. Las células de colon, fueron tratadas con el inhibidor de ChoK α , RSM932A, y 5-FU de forma individual o en combinación durante 48h (primero 24h con RSM932A y a continuación, 24h con 5-FU). Las células de pulmón se trataron durante 3-5h con cisplatino y a continuación con MN58b o RSM932A. Posteriormente se añadieron 50 μ l de detergente (NP40) para abrir poros en las membranas celulares que permitieran la entrada del IP, del que se añadió 1 ml a una concentración de 50 μ g/ml y RNasa a una concentración de 20 μ g/ml. El ADN que contenían aproximadamente 4×10^5 células teñidas con IP fue analizado usando el citómetro de flujo Coulter EPICS XL-MZL. Las diferentes secciones del ciclo celular: muerte, G0-G1, S y G2-M fueron analizadas usando el programa de análisis de ADN Multicycle av for Windows de Phoenix Flow Systems.

4.11 Extracción de ARN total procedente de líneas celulares

Las líneas tumorales SW620, HT29 y DLD-1 fueron incubadas durante 24h con los inhibidores de ChoK α a dos concentraciones diferentes. Para la extracción del ARN total de las distintas líneas se partió de $2,5 \times 10^5$ células y se extrajo con el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN se visualizó en un gel de agarosa al 1% y su integridad así como su cuantificación, se llevó a cabo en el espectrofotómetro Nanodrop ND 1000. Se utilizó 1 μ g de ARN para generar el ADNc usando el kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). La PCR cuantitativa se realizó por triplicado usando ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). El ARNm del 18S ribosomal fue utilizado como control interno de la PCR.

Las sondas utilizadas se compraron en Applied Biosystems como *Taqman Gene Expression Assays*.

- TS ID: Hs00426591_m1
- DUT ID: Hs00798995_s1
- RRM2 ID: Hs00357247_g1
- UPP1 ID: Hs00427695_m1
- 18s ID: 14319413E

4.12 Análisis estadístico

Los índices de correlación fueron determinados utilizando el análisis estadístico de Pearson chi-cuadrado. Las comparaciones de medias entre variables continuas se realizaron utilizando el test de Mean-Whitney. Se utilizó el test ANOVA para comparar las fases de ciclo. El índice de significación fue definido para $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa SPSS, versión 14.0 (Inc, Chicago, Illinois).

4.13 Consideraciones éticas

El uso de las muestras procedentes de tumores humanos para este estudio ha sido aprobado por el comité ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Todos los pacientes dieron un consentimiento informado. Así mismo, todos los animales de experimentación utilizados en este trabajo han sido mantenidos bajo las condiciones estándar de laboratorio siguiendo las directrices de la autoridad competente del Gobierno Español. El Real Decreto 1201/2005 en el que se regula el uso de animales en el

ámbito de la investigación y otros propósitos científicos. Este Real Decreto regula estrictamente todo lo relacionado con la reproducción, el mantenimiento, transporte y el uso experimental de los animales; así como los procesos de tratamiento, la anestesia y eutanasia.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Terapia combinatoria en cáncer colorrectal

5.1.1 Efectividad de la terapia combinada de inhibidores de ChoK α con 5-FU en cáncer colorrectal

Debido a que la ChoK α ha sido establecida como una nueva diana terapéutica, con un inhibidor específico en Fase I de ensayos clínicos, se determinó el efecto de la combinación de inhibidores de esta enzima con 5-FU, el fármaco antitumoral más utilizado en la actualidad frente al CCR. Para determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos de combinación, se estudió en primer lugar el efecto citotóxico de los inhibidores de ChoK α , MN58b y RSM932A, y del 5-FU, en las líneas tumorales SW620, HT29 y DLD-1. La IC₅₀ obtenida a las 72h de tratamiento en la línea tumoral HT29 se muestra en la tabla 3.

IC ₅₀ (μ M) 72h	HT29
RSM932A	1,5 \pm 0,42
MN58b	1,5 \pm 0,05
5-FU	3,8 \pm 1,40

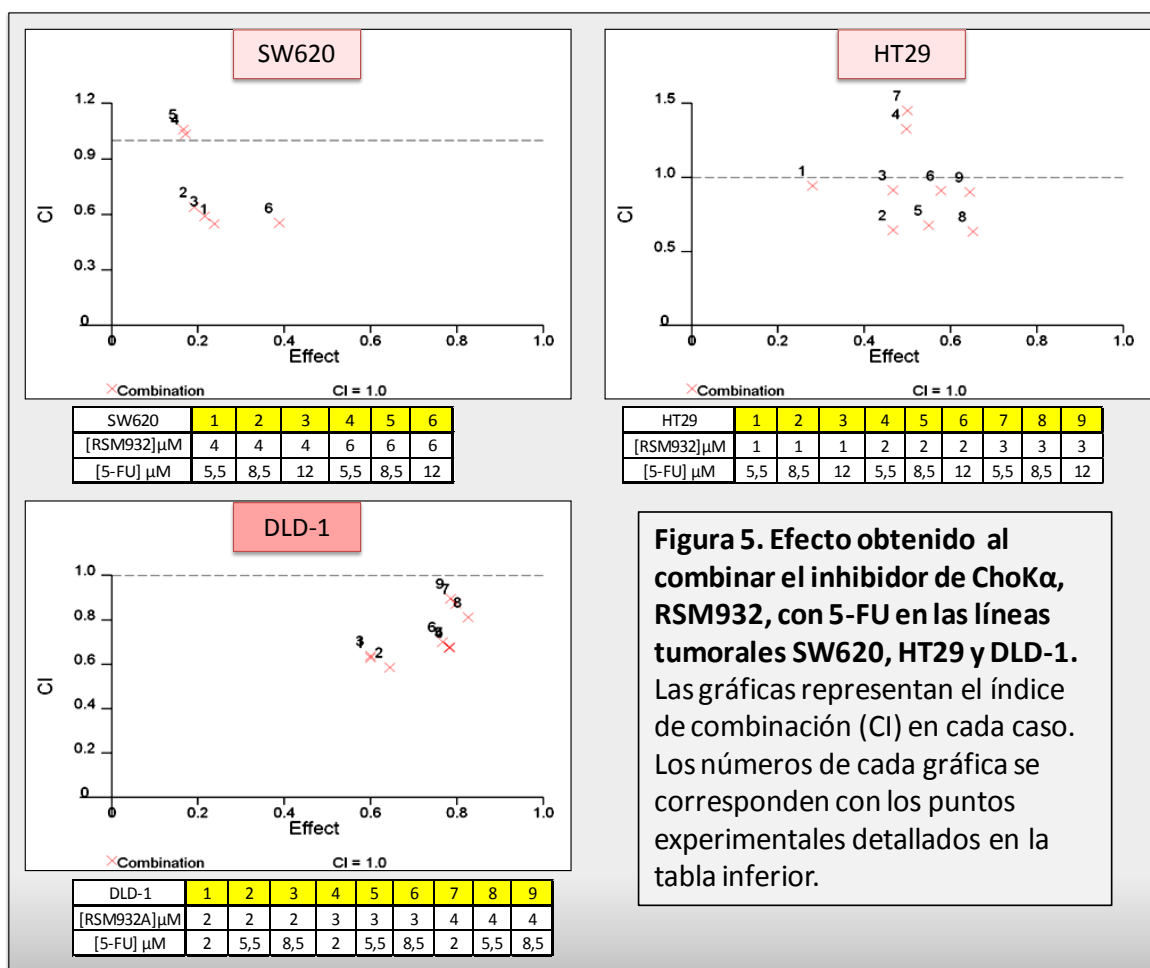
Tabla 3. Valor de IC₅₀ de la línea de cáncer colorrectal HT29. Se sembraron 6x10³ células en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación las células fueron expuestas a RSM932A, MN58b y 5-FU. 72h después se analizó la viabilidad celular y se calculó la IC₅₀. Los valores resultan de la media de al menos 3 ensayos independientes y cada ensayo fue realizado por cuadruplicado.

Para llevar a cabo los análisis de combinación, se probaron diferentes pautas de tratamientos variando el tiempo en el que las células estuvieron en presencia del fármaco, concentraciones de los mismos y secuencias de los tratamientos. Por un lado, se realizaron varios experimentos de tratamientos concomitantes o simultáneos, en los que se trataron a las células con ambos fármacos a la vez y por otro lado, se probaron distintas pautas de tratamientos secuenciales, iniciando el tratamiento con uno de los dos fármacos durante distintos tiempos para luego tratar con el segundo al retirar el medio

de cultivo, y viceversa. Tras varios experimentos, se identificó la pauta más eficaz, consistente en el tratamiento de las células de forma secuencial, tratando inicialmente con inhibidores de ChoK α , seguido del tratamiento con 5-FU. El estudio de proliferación celular fue realizado por ensayos de MTT según se describe en materiales y métodos.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando la ecuación de Chou y Talalay (Chou and Talalay, 1984) que proporciona información acerca de la combinación de los fármacos, obteniendo un índice de combinación (IC) indicativo de sinergismo cuando el valor es inferior a 1.

En la Figura 5, se muestra la gráfica obtenida por el programa Calcsyn, en el que se pueden observar los índices (IC) al combinar RSM932A con 5-FU ensayando distintas concentraciones de ambos fármacos en las tres líneas celulares analizadas. En la parte inferior de cada gráfica se encuentra la leyenda de las concentraciones utilizadas que se corresponde con su IC y que viene marcado en la gráfica con un aspa. Como se puede observar, la mayoritaria presencia de índices de combinación inferiores a 1 indica que la combinación de ambos fármacos es sinérgica, y además ofrece información acerca de la concentración de fármaco que es más efectiva para conseguir el mayor efecto sinérgico. Combinando MN58b y 5-FU se obtuvieron resultados similares a los mostrados combinando RSM932A y 5-FU (datos no mostrados).



A continuación, se analizó el efecto antiproliferativo al combinar los fármacos. La Figura 6 representa el porcentaje de células viables en las diferentes líneas tumorales con los dos inhibidores de ChoK α (RSM932A en el panel izquierdo y MN58b en el derecho) y el 5-FU, con sus correspondientes índices de combinación. Como se puede observar, la combinación secuencial de los inhibidores de ChoK α con 5-FU resultó ser sinérgica en todas las líneas celulares analizadas.

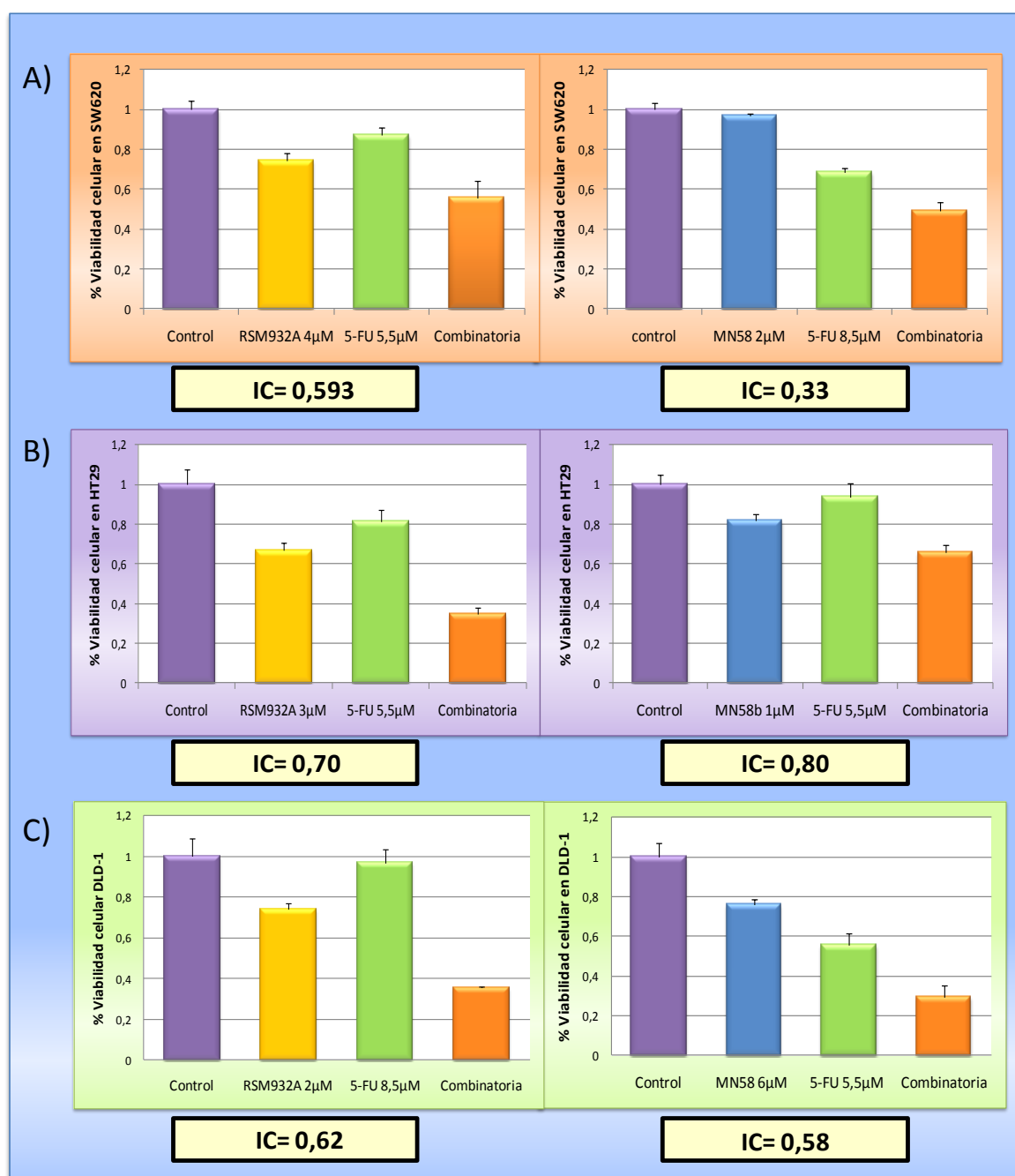


Figura 6. Efecto citotóxico en las líneas tumorales de CCR SW620, HT29 y DLD-1 de los inhibidores de ChoK α y 5-FU solos o en combinación. Se sembraron 6×10^3 células en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación las células fueron expuestas a RSM932A (gráficas de la columna izquierda) o a MN58b (gráficas de la columna derecha). A continuación se aspiró el medio y se añadió medio nuevo con 5-FU. El índice de combinación (IC) que se muestra es la media de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Un valor de IC < 1 indica que la combinación de los fármacos es sinérgica.
A) SW620. B) HT29. C) DLD-1.

Con el fin de profundizar en la efectividad del efecto citotóxico de esta combinación en células derivadas de adenocarcinomas colorrectales, se estudió por citometría de flujo, la muerte celular inducida por RSM932A y 5-FU solos o en

combinación. Como se muestra en la figura 7 y en la tabla 4, el análisis de los experimentos realizados por citometría de flujo confirmó que el efecto de los dos fármacos en combinación es superior al de cada uno de los dos fármacos por separado.

Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio demostraron que las células tumorales son sensibles a los inhibidores de ChoK α cuando están en la fase G1 del ciclo celular, mientras que no lo son cuando se encuentran en la fase S (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). El 5-FU es un fármaco que induce arresto celular en la fase S del ciclo celular (Yamane et al., 1999). Esta circunstancia explicaría el sinergismo obtenido al tratar las células, primero con inhibidores de ChoK α y a continuación con 5-FU y no con pautas alternativas, ya que podrían generar resistencia al tratamiento con los inhibidores de ChoK α .

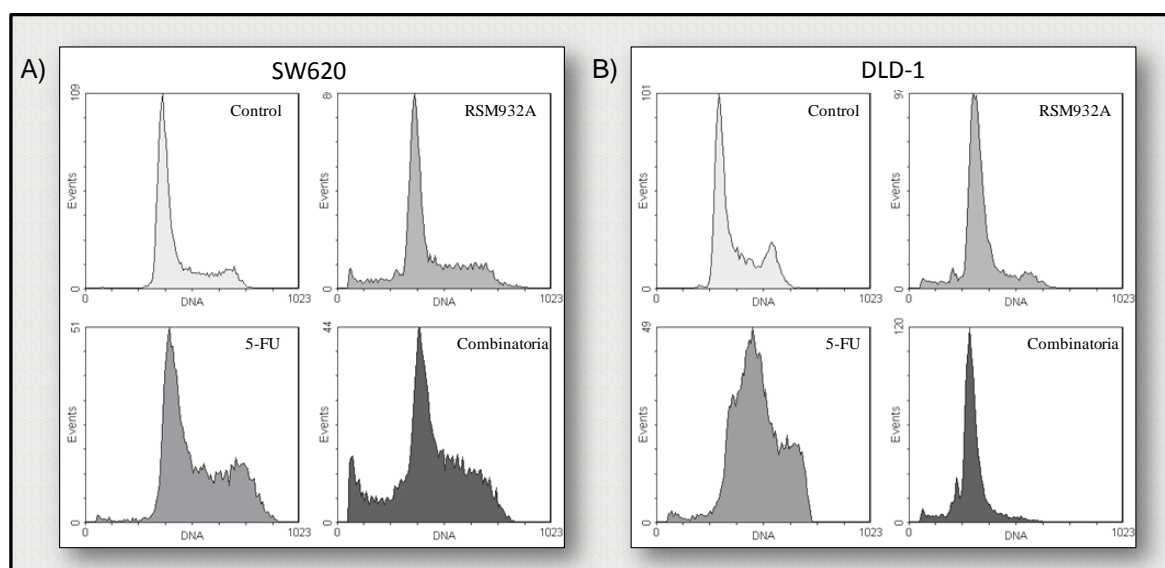


Figura 7. Distribución del ciclo celular en SW620 y DLD-1 tratadas con RSM932A y 5-FU solos o en combinación. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células tanto SW620 como DLD-1 en placas de 6 pocillos y se mantuvieron durante 24h en condiciones estándar de cultivo. A continuación se trataron durante 24h con RSM932A. Después se retiró el medio y se cambió por medio con 5-FU. La distribución celular en las distintas fases del ciclo se obtuvo mediante análisis por citometría de flujo. A) SW620. B) DLD-1.

A) SW620					B) DLD-1				
%	Muerte celular	G0/G1	S	G2/M	%	Muerte celular	G0/G1	S	G2/M
Control	1,4 ± 0,21	68,0 ± 1,48	19,5 ± 0,14	10,3 ± 1,97	Control	1,1 ± 0,07	58,2 ± 1,55	25,1 ± 5,79	15,5 ± 4,80
RSM932A	11,8 ± 0,84 *	59,7 ± 3,60	15,9 ± 3,46	12,2 ± 0,91	RSM932A	8,6 ± 0,35 *	64,55 ± 3,18	18 ± 3,11	7,7 ± 1,97
5-FU	3,1 ± 1,13	37,8 ± 12,30 *	40,4 ± 11,45	18,3 ± 0,42 *	5-FU	4,4 ± 0,56 *	15,4 ± 10,53 *	60,1 ± 11,45	17,8 ± 6,22
Combinatoria	22,1 ± 3,25 *	38,95 ± 1,62 *	24,3 ± 1,20 *	9,65 ± 1,90	Combinatoria	19,1 ± 2,61 *	65,4 ± 7,21	14,4 ± 7,07	2,65 ± 0,91

Tabla 4. Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular. Al analizar los resultados obtenidos con el citómetro se estimó el porcentaje de células que en cada fase del ciclo celular (Muerte, G0/G1, síntesis de ADN y G2M). El porcentaje de células en muerte celular resultó ser mayor al combinar los fármacos que tratando con cada fármaco por separado. A) SW620. B) DLD-1.

* Variaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$), comparando las distintas fases de ciclo con respecto al grupo control.

5.1.2 Efecto antitumoral obtenido al combinar inhibidores de ChoK α y 5-FU en xenografías de ratones inmunodeprimidos.

Con el fin de comprobar el efecto antitumoral *in vivo* de la combinación de inhibidores de ChoK α y 5-FU, se realizaron tres experimentos diferentes en xenografías de ratones inmunodeprimidos. En dos experimentos se inyectaron a los ratones células DLD-1 y se les trató con los inhibidores de ChoK α , MN58b y RSM932A, o con 5-FU solos o en combinación. Se realizó finalmente un experimento de validación utilizando la línea SW620 y combinando RSM932A como inhibidor de ChoK α con 5-FU.

En cada experimento se utilizaron 28 ratones y en cada lomo se inyectaron un millón de células. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 0,2cm³, los ratones fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de 7 ratones por grupo (14 tumores/grupo). La pauta de tratamiento fue la siguiente:

- Inhibidores de ChoK α : tres veces a la semana en días alternos a una dosis de 2 mg/kg durante tres semanas.
- 5-FU: dos días a la semana durante 3 semanas a una dosis de 40 mg/kg.
- Combinatoria: los inhibidores de ChoK α se administraron a razón de tres veces por semana y 5-FU 2 veces por semana a las mismas concentraciones indicadas en los tratamientos individuales.

Como se puede observar en las Figuras 8, 9 y 10, el tratamiento combinado de inhibidores de ChoK α con 5-FU en xenografías de cáncer de colon *in vivo* resulta en una mayor actividad antitumoral de forma significativa, confirmando los resultados obtenidos *in vitro*. Las tablas 5, 6 y 7 muestran el porcentaje de reducción tumoral y el valor

estadístico resultante (p) de cada uno de estos tratamientos. En todos los experimentos realizados, la reducción del volumen tumoral del grupo de combinatoria resultó ser estadísticamente significativa con respecto al control y también respecto a cada uno de los fármacos por separado, resultando todos los p values $< 0,05$ (Tablas 5, 6 y 7).

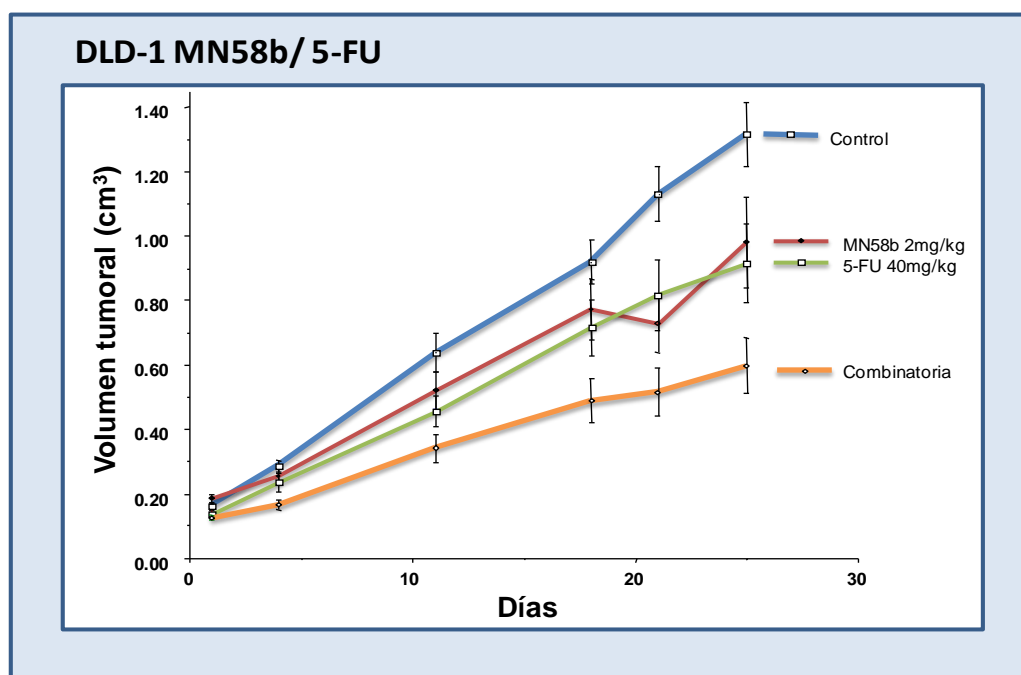


Figura 8. Efecto de la administración de MN58b + 5-FU en xenografías de DLD-1. Se representa la evolución del tamaño tumoral en los diferentes grupos. Grupo 1: Control, grupo 2: MN58b 2mg/kg, grupo 3 5-FU 40mg/kg y grupo 4 combinatoria MN58b + 5-FU.

DLD-1				
Grupos	% de inhibición tumoral	Valor de p vs. grupo control	Valor de p vs. MN58b	Valor de p vs. 5-FU
MN58b 2mg/Kg	30,32	0,014	-	0,717
5FU 40mg/Kg	31,65	0,004	0,717	-
Combinatoria	58,6	0,000053	0,015	0,048

Tabla 5. Porcentaje de inhibición tumoral y valores de significancia del experimento *in vivo* con DLD-1. En la primera columna se representa el porcentaje de inhibición tumoral de cada grupo con respecto al control. En la segunda columna el valor de p frente al grupo control. En la tercera columna se muestra cada grupo vs MN58b y en la última columna los valores de p vs. 5-FU.

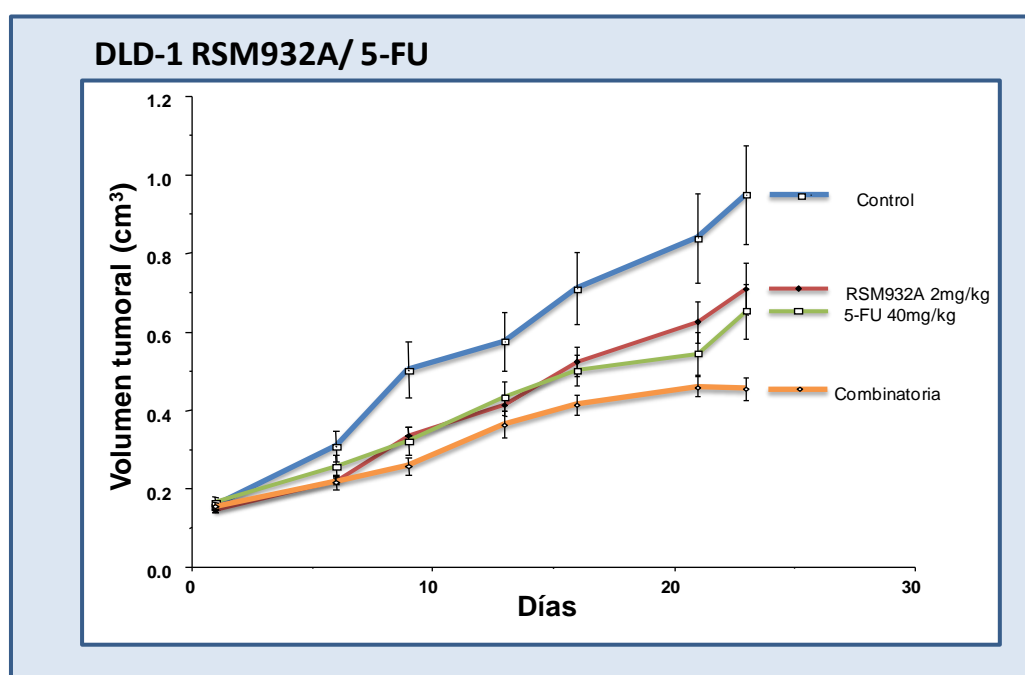


Figura 9. Evolución del tamaño tumoral después de la administración del inhibidor de ChoK α + 5-FU en xenografías de DLD-1. Los grupos en este experimento fueron los siguientes: grupo 1: control, grupo 2: RSM932A 2mg/kg, grupo 3 5-FU 40mg/kg y grupo 4 combinatoria RSM932A+ 5-FU.

DLD-1				
Grupos	% de inhibición tumoral	Valor de p vs. grupo control	Valor de p vs. RSM932A	Valor de p vs. 5-FU
RSM932A 2mg/Kg	28,96	0,176	-	1,0
5FU 40mg/Kg	38,62	0,091	1,0	-
Combinatoria	62,03	0,000471	0,001	0,01

Tabla 6. Porcentaje de inhibición tumoral y valores de significancia del experimento *in vivo* con DLD-1. Se muestran los valores de porcentaje de inhibición de cada grupo con respecto al control. Los valores de p menores de 0,05 muestran que el valor es significativo. Se ha calculado p para cada grupo con respecto al control. El grupo de combinatoria frente a los fármacos por separado y los dos fármacos solos entre sí.

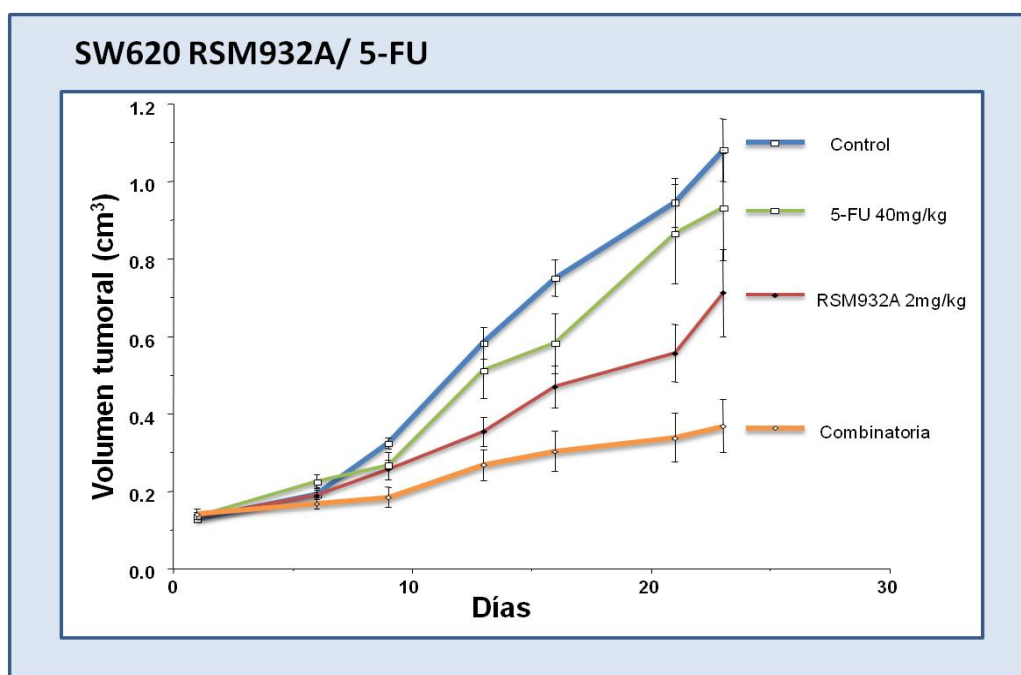


Figura 10. Efecto de la administración de RSM932A + 5-FU en xenografías de SW620. Grupo 1: control, grupo 2: RSM932A 2mg/kg, grupo 3 5-FU 40mg/kg y grupo 4 combinatoria RSM932A+ 5-FU.

SW620				
Grupos	% de inhibición tumoral	Valor de p vs. grupo control	Valor de p vs. RSM932A	Valor de p vs. 5-FU
RSM932A 2mg/Kg	39,05	0,021	-	0,283
5FU 40mg/Kg	16,04	0,553	0,283	-
Combinatoria	76,18	0,00011	0,018	0,005

Tabla 7. Porcentaje de inhibición tumoral y valores de significancia del experimento *in vivo* con SW620. Al igual que en las tablas anteriores en la primera columna está representado el porcentaje de inhibición tumoral de los grupos 2, 3 y 4 con respecto al control. En la segunda columna el valor de p frente al grupo control. En la tercera columna se muestra cada grupo vs RSM932A y en la cuarta columna los valores de p vs. 5-FU.

5.1.3 Los inhibidores de ChoK α modulan los niveles de ARNm de enzimas clave de la ruta de metabolización del 5-FU.

Para entender la razón por la cual existe sinergismo en la combinación de los inhibidores de ChoK α con 5-FU es importante estudiar y entender las bases moleculares implicadas en su mecanismo de acción. Como se ha descrito en la introducción, el 5-FU ejerce su acción inhibidora de la proliferación por interferencia con el metabolismo de la uridina y la timidina, por lo que este trabajo se ha centrado en el estudio del efecto de los inhibidores de ChoK α sobre la ruta en la que actúa el 5-FU. Para ello, se ha determinado el efecto que tienen los inhibidores de ChoK α en el nivel de ARNm de enzimas responsables de la regulación del metabolismo de la timidina o síntesis de desoxirribonucleótidos, como la timidilato sintasa (TS), la desoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa) y la ribonucleótido reductasa 2 (RRM2).

5.1.4 La inhibición de ChoK α induce la disminución de los niveles de ARNm de TS, RRM2 y DUT en DLD-1, SW620 y HT29.

La drástica reducción encontrada en los niveles de las proteínas en los casos estudiados (TS, dUTPasa y RRM2) tras la inhibición de ChoK α , nos sugirió un mecanismo de regulación común a todas ellas. Una posible explicación podría ser un efecto a nivel de regulación transcripcional. Por lo que se abordó el estudio de los niveles de expresión de los genes de la ruta de síntesis de timidina.

Basándonos en los resultados obtenidos a nivel de proteína, tratamos las líneas tumorales SW620, HT29 y DLD-1 con MN58b y RSM932A durante 24 horas. El nivel de ARNm fue estudiado por PCR cuantitativa utilizando las sondas específicas: Hs00426591_m1 (*TYMS*, TS), Hs00798995_s1 (*DUT*, dUTPasa) y Hs00357247_g1 (*RRM2*). Finalmente, el tratamiento con inhibidores de ChoK α produjo una importante reducción de los niveles de ARNm de *TYMS*, *DUT* y *RRM2*, donde se obtuvieron disminuciones de expresión de hasta un 90% con respecto al control. SW620 (fig. 11), HT29 (fig. 12) y DLD-1 (fig. 13).

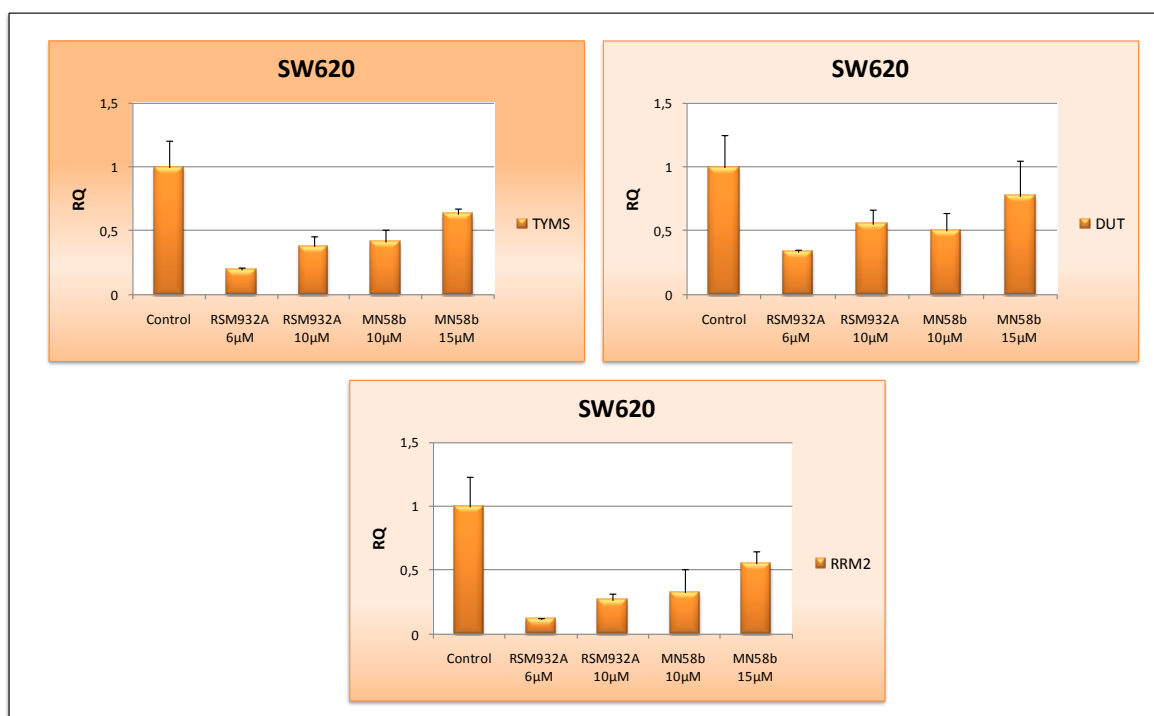


Figura 11. Niveles de ARNm de TYMS, DUT y RRM2 en SW620. Se sembraron 2×10^5 células en placas de 6 pocillos y se trataron con dos concentraciones de inhibidores de ChoK α (6 y 10 μ M en el caso de RSM932A y 10 y 15 μ M para MN58b) durante 24h. Como gen endógeno se utilizó 18s.

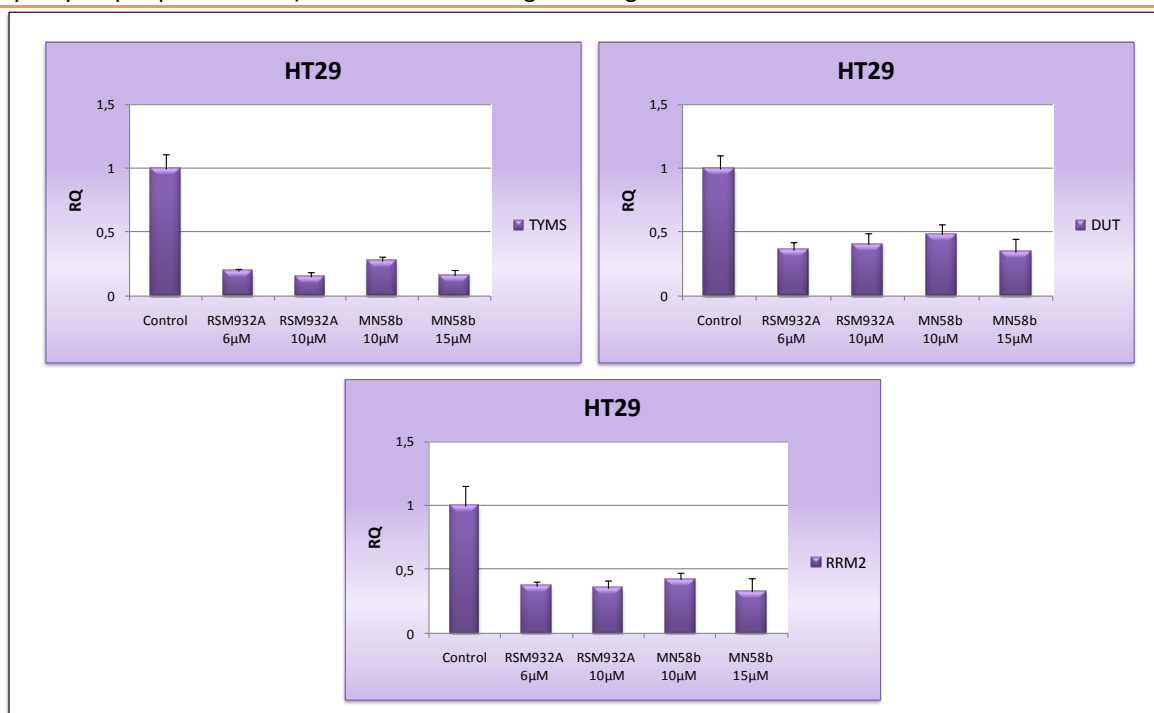


Figura 12. Niveles de ARNm TYMS, DUT y RRM2 en HT29. Se sembraron 2×10^5 células en placas de 6 pocillos y se trataron con dos concentraciones de inhibidores de ChoK α (6 y 10 μ M en el caso de RSM932A y 10 y 15 μ M para MN58b) durante 24h. Como gen endógeno se utilizó 18s.

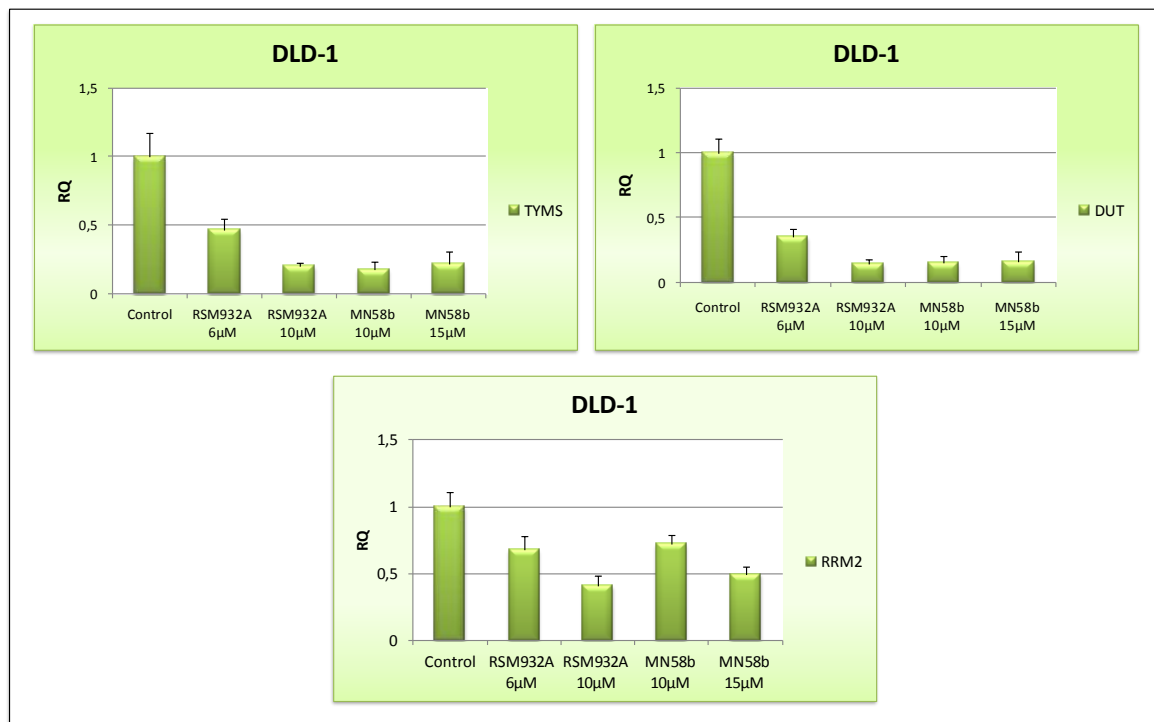


Figura 13. Niveles de ARNm TYMS, DUT y RRM2 en DLD-1. Se sembraron 2×10^5 células en placas de 6 pocillos y se trataron con dos concentraciones de inhibidores de ChoK α (6 y 10 μ M en el caso de RSM932A y 10 y 15 μ M para MN58b) durante 24h. Como gen endógeno se utilizó 18s.

Los resultados obtenidos en todos los casos fueron similares a los observados en la determinación de los niveles de proteína, por lo que se puede afirmar que existe una regulación coordinada a nivel transcripcional. Por tanto, la disminución observada en los niveles de expresión de TS, dUTPasa y RRM2 es consistente con la disminución de los niveles de sus respectivos ARNm, sugiriendo que la regulación se produce a nivel transcripcional.

5.2 Terapia combinatoria en cáncer de pulmón

5.2.1 Resistencia intrínseca a la inhibición de ChoK α por MN58b y otros fármacos antitumorales utilizados en clínica en pacientes con CPNM

Como se ha descrito en la introducción, el cáncer de pulmón constituye todavía un importante problema clínico lejos de resolverse, con tasas de mortalidad cercanas al 90% a los cinco años del diagnóstico. Por ello es necesario incrementar el arsenal terapéutico disponible en la clínica, basado en un mejor conocimiento de las características moleculares de los tumores.

En estudios preliminares de nuestro grupo, se ha observado que los inhibidores de ChoK α muestran un amplio espectro de actividad antiproliferativa y antitumoral, incluyendo líneas derivadas de tumores humanos de pulmón (Ramírez de Molina et al., 2007).

Debido a la necesidad de identificar nuevas terapias frente al cáncer de pulmón, y los resultados preliminares obtenidos, se estudió la eficacia del tratamiento de los inhibidores de ChoK α en muestras de tumores primarios, comparado con los tratamientos estándar utilizados en la clínica. Para ello, en colaboración con el grupo de la Dra. Rosario Perona, se realizó un estudio en 84 pacientes con CPNM procedentes del Hospital de la Paz, en el que se establecieron cultivos primarios de las piezas quirúrgicas de tumores de pulmón no microcítico que se mantuvieron en cultivo durante 10 días. Los cultivos fueron tratados con concentraciones crecientes de MN58b, hasta un máximo de 20 μ M lo que suponía de 7 a 50 veces la IC₅₀ obtenida en líneas celulares humanas derivadas de CPNM. Se observaron diferentes respuestas al tratamiento (Fig. 14):

- El 46,4% de los cultivos primarios de estos pacientes, correspondiente a 39 muestras, presentaron gran resistencia al fármaco, casi todas se mantuvieron vivas en presencia de la máxima concentración de MN58b hasta el día 10.
- El 53,6% de los cultivos primarios de los pacientes, correspondiente a 45 muestras, fueron sensibles al tratamiento. Dentro de este grupo, 15 tumores (33,3%) presentaron una alta sensibilidad al fármaco, ya que las células eran totalmente inviables al final del tratamiento, incluso a bajas concentraciones, y 30 tumores (66,7%) de este grupo se

consideraron parcialmente sensibles al fármaco, ya que al final del tratamiento aproximadamente el 50% de las células estaban vivas.

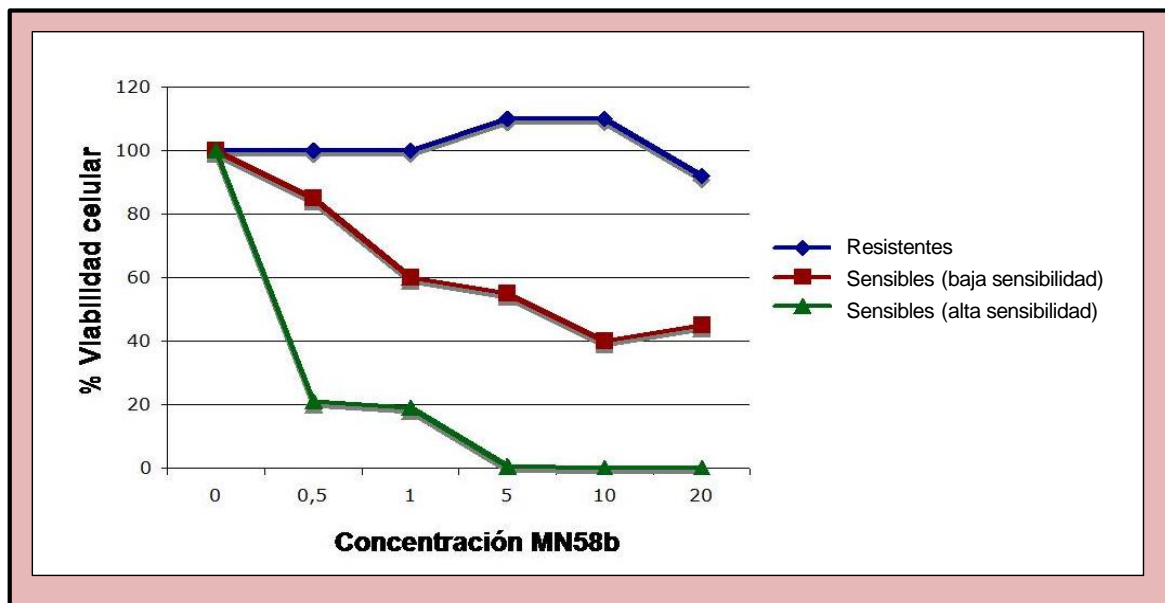


Figura 14. Curvas de proliferación celular de los cultivos primarios de muestras de pacientes con CPNM tratados con el inhibidor de ChoK α , MN58b. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 10 días en presencia de MN58b. La cuantificación celular se realizó mediante tinción con violeta cristal medido a 595nm. Se muestran las curvas representativas de cada una de las respuestas tipo encontradas, con alta resistencia (rombos azules), alta sensibilidad (triángulos verdes) y sensibilidad intermedia (cuadrados rojos).

De los cultivos primarios de los tumores de estos pacientes con CPNM, 62 fueron tratados también de forma paralela e independiente con cisplatino o taxol, 52 con gemcitabina y 39 con vinorelbina con el fin de comparar los niveles resistencia y sensibilidad a cada fármaco, y contrastarlos con los resultados obtenidos tras la inhibición de ChoK α .

La tabla 9 muestra los tumores que fueron tratados con los fármacos citados anteriormente, encontrándose la mayor tasa de respuesta frente a MN58b con un 55,5% de los tumores sensibles, seguido de cisplatino con un 50% de respuesta al fármaco.

Fármaco	Total	Sensibles	Resistentes
MN58b	63	35 (55,5%)	28 (44,4%)
Cisplatino	62	31 (50,0%)	31 (50,0%)
Taxol	62	27 (43,5%)	35 (56,5%)
Gemcitabina	52	18 (34,6%)	34 (65,4%)
Vinorelbina	39	15 (38,5%)	24 (61,5%)

Tabla 9. Sensibilidad y resistencia de tumores de pacientes con CPNM a distintos fármacos antitumorales. Se trataron las muestras de los pacientes con los fármacos MN58b, cisplatino, taxol, gemcitabina y vinorelbina y se analizó el porcentaje de sensibilidad y resistencia a los fármacos.

Se analizó estadísticamente mediante la correlación de Pearson, la significancia bilateral entre dichos tratamientos, con el fin de identificar la existencia de una posible correlación cruzada. Como se muestra en la tabla 10, mientras que existe una correlación entre la resistencia intrínseca del tumor a cisplatino, taxol y vinorelbina, no existe ninguna correlación entre la resistencia intrínseca observada a la inhibición de ChoK α por MN58b con ninguno de los tratamientos, sugiriendo que sus mecanismos de resistencia son diferentes y por tanto la inhibición de ChoK α podría ser una buena alternativa de tratamiento para pacientes resistentes a estos fármacos convencionales. Por otro lado, al no existir correlación entre MN58b y cisplatino, se podría producir un posible efecto potenciado por la combinación de ambos fármacos.

Correlación						
		MN58b	Cisplatino	Taxol	Vinorelbina	Gemcitabina
MN58b	Correlación de Pearson	1	-0,096	-0,09	-0,124	0,133
	Significancia bilateral		0,46	0,488	0,45	0,346
	N	63	62	62	39	52
Cisplatino	Correlación de Pearson	-0,096	1	0,319 (*)	0,469 (**)	0,074
	Significancia bilateral	0,46		0,012	0,003	0,603
	N	62	62	62	39	52
Taxol	Correlación de Pearson	-0,09	0,319 (*)	1	0,421 (**)	0,364 (**)
	Significancia bilateral	0,488	0,012		0,008	0,008
	N	62	62	62	39	52
Vinorelbina	Correlación de Pearson	-0,124	0,469 (**)	0,421 (**)	1	0,174
	Significancia bilateral	0,45	0,003	0,008		0,304
	N	39	39	39	39	37
Gemcitabina	Correlación de Pearson	0,133	0,074	0,364 (**)	0,174	1
	Significancia bilateral	0,346	0,603	0,008	0,304	
	N	52	52	52	37	52

Tabla 10. Análisis estadístico de correlación entre la resistencia intrínseca de los tumores de CPNM a los fármacos MN58b, cisplatino, taxol, gemcitabina y vinorelbina.

* Correlación significativa $p < 0,05$ (bilateral).

** Correlación significativa $p < 0,01$ (bilateral)

5.2.2 Resistencia adquirida a la inhibición de ChoK α por MN58b

Una vez realizado el análisis estadístico de correlación entre la resistencia intrínseca a los distintos fármacos en los cultivos primarios de tumores de pacientes con CPNM, se profundizó en el estudio de la resistencia a los inhibidores de ChoK α MN58b y RSM932A. Para ello, se generaron dos líneas resistentes a los inhibidores de ChoK α partir de las células tumorales humanas de CPNM, H460, que fueron denominadas H460 MN58R y H460 RSM932AR. Estas líneas celulares se mantuvieron en cultivo durante 9 meses aumentando progresivamente la dosis del fármaco hasta alcanzar una dosis de 0,4 μ M para MN58b y 8 μ M para RSM932A. Como se observa en la tabla 11, el valor de la IC₅₀ en la línea resistente H460 a MN58R, fue aproximadamente 50 veces mayor que en las células no resistentes. La línea resistente a RSM932A resultó ser 10 veces más resistente

al RSM932A que la no resistente. Esta línea tratada con MN58b mostró una resistencia al MN58b 55 veces superior que la línea parental con lo que se observa que en estas líneas existe una resistencia cruzada entre los inhibidores de ChoK α , consistente con un mismo mecanismo de acción.

Línea celular	IC ₅₀ MN58b(μ M) 72h	IC ₅₀ RSM932A(μ M) 72h
H460	0,5 \pm 0,1	1,11 \pm 0,11
H460 MN58bR	21,2 \pm 1,4 (42)	8,7 \pm 0,7 (8)
H460 RSM932AR	27,6 \pm 6,2 (55)	11,2 \pm 1,7 (10)

Tabla 11. Sensibilidad al tratamiento con los inhibidores de ChoK α MN58b y RSM932A en líneas resistentes a estos fármacos. Concentraciones (μ M) a las que se obtiene un 50% del crecimiento celular (valores de IC₅₀) a las 72h de tratamiento. Los valores resultan de la media de al menos 3 ensayos independientes y cada ensayo fue realizado por cuadruplicado. Entre paréntesis se indica cuantas veces son más resistentes al fármaco las líneas tumorales con respecto a la línea original.

5.2.3 Estudio de la resistencia cruzada entre MN58b y cisplatino

Como se mencionó en el apartado 5.2.1, la resistencia intrínseca al fármaco MN58b no está relacionada con la resistencia al cisplatino. Con el objetivo de comprobar los datos obtenidos de los pacientes, así como verificar si este efecto se mantiene en el caso de resistencia adquirida, se analizó el efecto antiproliferativo del cisplatino en las líneas resistentes a los inhibidores de ChoK α en comparación con la línea parental. Como se observa en la tabla 12, las líneas resistentes H460 MN58R y H460 RSM932AR, no son más resistentes al cisplatino sino al contrario, son más sensibles al efecto del cisplatino que la línea H460 parental. Con este resultado se demuestra que los mecanismos de resistencia entre los inhibidores de ChoK α y el cisplatino son independientes. Por tanto, estos resultados sugieren que los inhibidores de ChoK α podrían ser utilizados como fármacos antitumorales en pacientes con CPNM que no responden al cisplatino.

Línea celular	IC ₅₀ cDDP (μ g/ml) 72h	Tabla 12. Sensibilidad al tratamiento con cisplatino. Concentraciones (μ M) a las que se obtiene un 50% del crecimiento celular (valores de IC ₅₀) a las 72h de tratamiento. Los valores mostrados resultan de la media de al menos 3 ensayos independientes y cada ensayo fue realizado por triplicado. Entre paréntesis se indica cuantas veces son más sensibles las líneas tumorales parentales al cisplatino con respecto a las líneas resistentes H460 MN58R y H460 RSM932A.
H460	4,5 \pm 0,5	
H460 MN58bR	1,8 \pm 0,3 (2,5)	
H460 RSM932AR	1,1 \pm 0,2 (4,1)	

5.2.4 Efectividad de la terapia combinada con cisplatino y los inhibidores de ChoK α en CPNM

Los resultados anteriores son la base para estudiar si una terapia combinada de cisplatino con los inhibidores de ChoK α podría potenciar el efecto antitumoral del cisplatino y de los inhibidores de ChoK α en monoterapia, disminuyendo tanto la toxicidad como la resistencia asociada a cada tratamiento individual. Con el fin de verificar el efecto de una terapia combinada, en primer lugar se realizaron distintos experimentos *in vitro* utilizando la línea tumoral humana derivada de CPNM H460. La viabilidad celular con los inhibidores de ChoK α , cisplatino y la combinación de ambos se determinó mediante ensayos de MTT. Con el fin de disminuir la toxicidad al utilizar una combinación de ambos fármacos, las concentraciones utilizadas en ambos casos fueron subóptimas. Se realizaron distintos esquemas y pautas de tratamiento concomitante y secuencial. Tras las distintas pruebas realizadas, determinamos que el tratamiento más eficaz es aquel en el que ambos fármacos se administraron de forma secuencial, tratando primero con cisplatino a tiempos cortos (intervalos de 3 a 5 horas), y a continuación con los inhibidores de ChoK α , RSM932A o MN58b, a tiempos largos (aproximadamente 40 h). Resultados similares se obtuvieron con una segunda línea tumoral de CPNM, H1299 (resultados no mostrados). El análisis del índice de combinación Chou & Talalay como se describe en Materiales y Métodos, indicó un fuerte sinergismo ($CI < 0,5$) entre ambos fármacos (figura 15), lo que nos demostró que la combinación de ambos tipos de fármacos es potencialmente útil para controlar el crecimiento tumoral de CPNM.

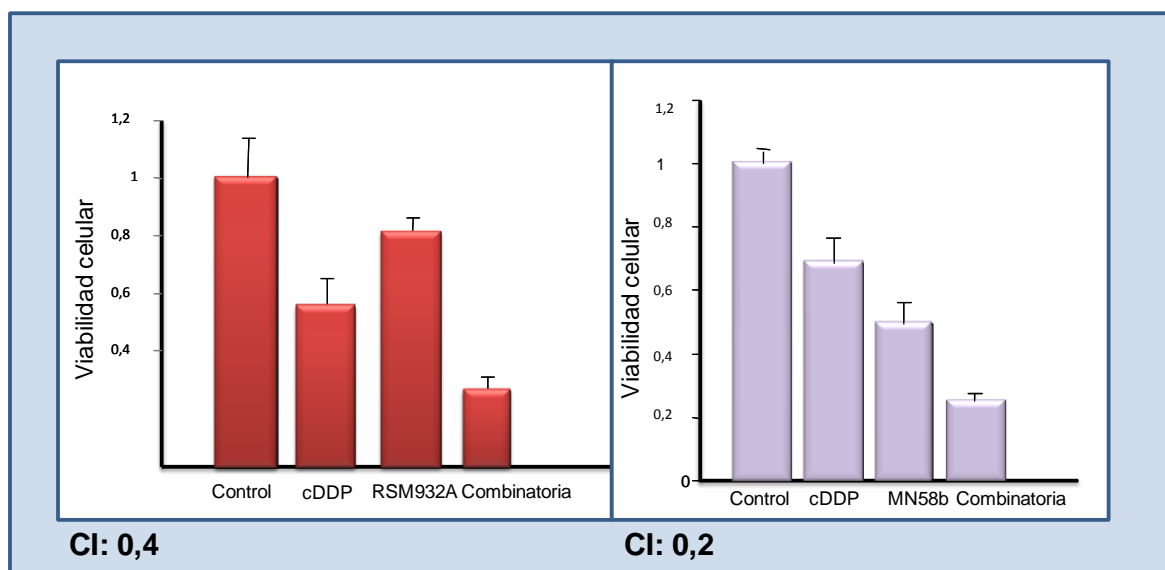


Figura 15. Efecto de los fármacos RSM932A, MN58, cisplatino y la combinación en células de CPNM, H460 en combinación. La concentración utilizada de RSM932A es de 1 μ M, la de MN58b es 0,25 μ M y la de cisplatino 3,5 μ M. El índice de combinación fue IC=0,4 para la combinación RSM932A y cDDP y IC=0,2 para MN58b y cDDP.

5.2.5 Efecto *in vivo* de la combinación de los inhibidores de ChoK α y cisplatino en xenografías de CPNM

Finalmente, y basándonos en los datos obtenidos *in vitro*, se estudió si existía sinergismo *in vivo* entre cisplatino y los inhibidores de ChoK α en xenografías de células derivadas de CPNM. Para este estudio partimos de 6 grupos de ratones con 7 ratones por grupo, a los que se les inyectaron 1 millón de células de CPNM, H460, en cada lomo. Los grupos controles fueron 3, un grupo control al que se le inyectó el vehículo (PBS), un grupo control de cisplatino al que se le inyectó este fármaco 2 veces por semana a una dosis de 1mg/kg durante 3 semanas y el grupo control de MN58b al que se le inyectó el fármaco a una dosis de 2mg/kg 3 veces por semana durante 3 semanas. A los grupos de ratones 4 y 5 se les inyectaron los fármacos en combinación, con dos pautas diferentes, al grupo 4 se les inyectaron los fármacos de forma secuencial siguiendo un esquema basado en la mejor pauta observada *in vitro*, y al grupo 5 de forma concomitante. Al grupo secuencial se les inyectaron 2 dosis de cisplatino por semana durante 2 semanas y 3 dosis de MN58b 3 por semana durante 1 semana y al grupo concomitante 2 dosis de cisplatino por semana y 3 dosis de MN58b por semana.

La dosis administrada de los 2 fármacos fue subóptima, es decir, inferior a la concentración utilizada en monoterapia capaz de reducir el volumen tumoral de manera significativa, por lo que se esperaba que la reducción del tamaño de los tumores en los grupos control de fármacos fuera modesta.

Los resultados que se muestran en la figura 17 indican que la progresión del volumen tumoral de los grupos de ratones que habían recibido el tratamiento de los dos fármacos en combinación tanto secuencial como concomitante, era claramente menor respecto a la administración de cada fármaco por separado.

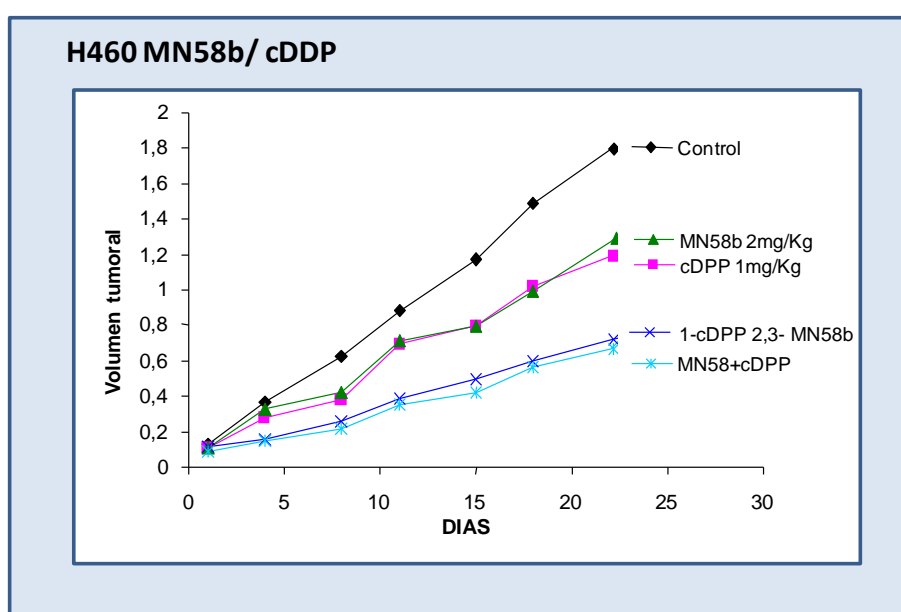


Figura 17. Actividad antitumoral frente a xenografías de H460 en ratones tratados con MN58b y Cisplatino. Grupo 1: Control. Grupo 2: MN58b 2mg/kg. Grupo 3: cDDP 1mg/kg. Grupo 4: Combinatoria 1, 1ª semana cDDP- 2ª y 3ª semana MN58b. Grupo 5: Combinatoria 2, cDDP y MN58b en días alternos.

En la tabla 13 se muestran los porcentajes de reducción tumoral de los grupos control que recibieron fármaco y de los grupos que recibieron los 2 fármacos en combinación y la significancia estadística correspondiente a cada grupo. Como esperábamos, la reducción tumoral en los grupos control no fue significativa, sin embargo, en los grupos secuencial y concomitante la reducción fue significativa ($p < 0,05$). Hay que destacar que mientras con los tratamientos combinados no se encontró variación en el peso de los ratones como primera medida de toxicidad asociada al tratamiento, para lograr el mismo efecto antitumoral con el cisplatino se observó una

reducción de más del 25% en el peso corporal (17,44 vs. 23,4gr), indicativa de una alta toxicidad asociada al fármaco.

Grupo	Fármaco	Media pesos	% de inhibición tumoral	p
1. Control	Vehículo	23,4		
2. Inhibidor de ChoK α	MN58b 2mg/kg	23	30%	0,35
3. cDDP	cDDP 1mg/kg	24,4	35%	0,17
4. Combinatoria 1	cDDP 1mg/kg	23,9	64%	0,028
	MN58b 2mg/kg			
5. Combinatoria 2	cDDP 1mg/kg	22,5	66%	0,028
	MN58b 2mg/kg			
6. Control cDDP	cDDP 4mg/kg	17,44	69%	0,014

Tabla 13. Porcentaje de reducción tumoral de los grupos tratados frente al grupo control y los valores de significancia correspondientes. Se calcularon los porcentajes de inhibición en cada grupo de ratones y se analizó estadísticamente para comprobar la significancia de la reducción tumoral. (Porcentaje de reducción significativa $p < 0,05$).

Se realizó un experimento similar con un segundo inhibidor de ChoK α , el RSM932A. Los resultados se muestran en la figura 18 y los porcentajes de reducción tumoral y los valores de significancia en la tabla 15.

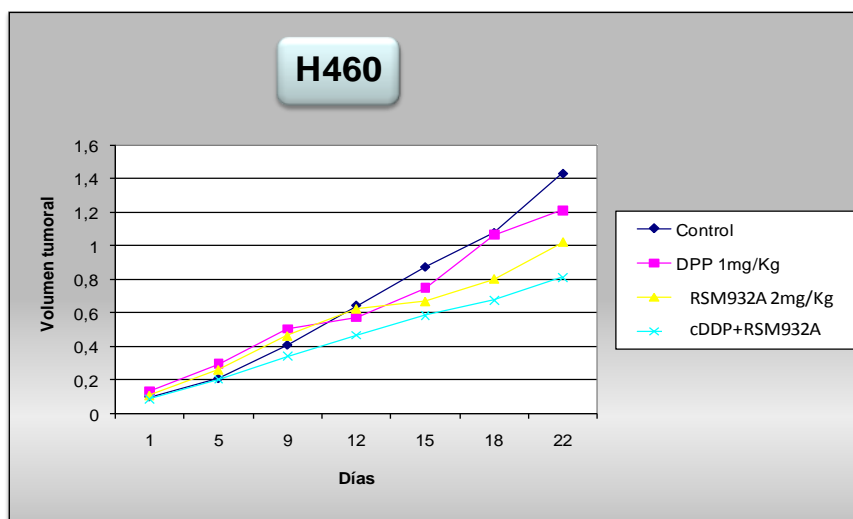


Figura 18. Efecto de la administración de Cisplatino y RSM932A en xenografías de CPNM. En el experimento se utilizó la línea tumoral H460. Los grupos fueron: Grupo 1: Control; grupo 2: RSM932A 2 mg/kg; grupo 3: Cisplatino a 1mg/kg; y grupo 4: combinatoria de ambos fármacos, la primera semana se administró cisplatino y las dos siguientes RSM932A.

Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la combinación de inhibidores de ChoK α con cisplatino puede constituir una nueva terapia prometedora en CPNM ya que *in vivo* se consigue una potente actividad antitumoral reduciendo significativamente la toxicidad del tratamiento.

Discusión

6 Discusión

Los constantes avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer están ayudando a los especialistas a elegir la mejor opción de tratamiento de la enfermedad. Puesto que el cáncer es una enfermedad compleja, en la que intervienen múltiples factores, es necesaria la identificación de dianas terapéuticas específicas contra las que diseñar nuevos fármacos. La combinación de fármacos dirigidos contra diferentes dianas está siendo esencial para obtener una mejor respuesta. Por esto, el número de ensayos clínicos en progreso para mejorar los esquemas de tratamiento es muy amplio. A pesar de todos los esfuerzos que se han realizado, todavía es necesario estudiar y desarrollar nuevas estrategias antitumorales con el fin de mejorar las tasas de curación y supervivencia actuales.

La terapia dirigida, ha sido definida como un tratamiento cuyo mecanismo está enfocado a interferir específicamente una diana terapéutica o ruta biológica (Bandres et al., 2007). Este modelo puede constituir un gran avance en la calidad de vida del paciente, si el tratamiento actúa específicamente contra las células tumorales y no contra las normales provocando menos efectos adversos, en contraposición con los tratamientos convencionales, asociados a mayor toxicidad.

En una gran variedad de tumores humanos y líneas incluyendo CCR, mama, vejiga, pulmón y ovario se ha demostrado que la enzima colina quinasa alfa (ChoK α) está sobreexpresada (Ramirez de Molina et al., 2002a; Ramirez de Molina et al., 2002c; Ramirez de Molina et al., 2004; Iorio et al., 2005; Ramirez de Molina et al., 2007; Hernando et al., 2009; Iorio et al., 2010). Una característica común en muchos tipos de cáncer es el aumento de los niveles de metabolitos de la colina, incluyendo la fosfocolina (PCho), que es el producto directo de la actividad de ChoK α (Podo et al., 1996; Nakagami et al., 1999b; Al-Saffar et al., 2006; Glunde and Serkova, 2006).

El aumento de la actividad colina quinasa y de sus metabolitos en las células tumorales, ha permitido la aplicación de derivados de colina como radiotrazadores oncológicos PET. La colina marcada con ^{11}C se utiliza en la actualidad para la detección de diferentes tumores como piel, colon y mama (Leyton et al., 2009; Contractor et al., 2011).

Por último, estudios recientes confirman que la alteración de los niveles de ChoK α en tumores humanos está asociada con una mayor malignidad del tumor (Ramirez de

Molina et al., 2002a; Ramirez de Molina et al., 2007; Hernando et al., 2009) habiéndose identificado la ChoK α como un nuevo factor pronóstico independiente, en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en fases tempranas. Esto permite predecir el riesgo de recurrencia y también identificar pacientes con pronóstico favorable que podrían recibir tratamientos menos agresivos e incluso evitar tratamientos sistémicos adyuvantes (Ramirez de Molina et al., 2007).

La demostración de la importancia de ChoK α en el desarrollo tumorigénico nos permite confirmar que ChoK α constituye una nueva diana muy interesante para el desarrollo de terapias antitumorales. En este sentido, se han sintetizado inhibidores de ChoK α que interfieren específicamente con su actividad, y se ha demostrado que la interferencia específica del ARNm de ChoK presenta una potente actividad antiproliferativa y antitumoral (Glunde et al., 2005; Banez-Coronel et al., 2008; Yalcin et al., 2010; Clem et al., 2011). Entre ellos, destacan por su potente actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, MN58b y un derivado de última generación, RSM932A.

6.1 Cáncer colorrectal

La terapia más utilizada en cáncer colorrectal (CCR) está basada en la combinación de 5-FU con otros agentes quimioterápicos como por ejemplo el oxaliplatino, o el inhibidor de la topoisomerasa I, CPT-11 (Irinotecan) (Machover et al., 1996; Van Cutsem et al., 1998; Saltz et al., 2000). Diversos estudios demuestran que la combinación del 5-FU con otros fármacos citotóxicos, aumenta la tasa de respuesta desde un 10-15% cuando se utiliza 5-FU en monoterapia, hasta un 40-50% cuando se hace en combinación (Giacchetti et al., 2000; Douillard et al., 2003).

Para la realización de la presente memoria han sido utilizados dos inhibidores de ChoK α (MN58b y RSM932A) en combinación con 5-FU, como una nueva alternativa en el tratamiento actual de CCR y que suponga una mejora de las terapias actuales.

Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran un efecto sinérgico cuando combinamos los inhibidores de ChoK α con 5-FU en tres líneas diferentes de CCR. Este mismo efecto también ha sido observado *in vivo* en xenografías de ratones inmunodeprimidos en las que la inhibición del crecimiento tumoral se ha visto incrementada de forma significativa.

También hemos investigado el posible mecanismo por el que se obtiene sinergismo al combinar los inhibidores de ChoK α con el 5-FU para obtener un mayor conocimiento y mejorar su uso en clínica.

En un trabajo previo del grupo de Zaver Bhujwalla, la combinación de un ARN interferente para ChoK α con el 5-FU demostró una disminución de la viabilidad celular y de la proliferación de forma cooperativa en cáncer de mama (Mori et al., 2007). Sin embargo, este estudio no aporta ninguna información sobre el posible mecanismo que subyace al efecto cooperativo de ambos fármacos. El ARN interferente descrito por los autores podría interferir la síntesis de ChoK α y ChoK β lo que dificulta la interpretación de los resultados, pues ambas enzimas han mostrado tener funciones diferentes en el proceso tumorigénico, tanto en células como en ratones transgénicos (Gallego-Ortega et al., 2009; Wu et al., 2009, 2010; Gallego-Ortega et al., 2011).

Los resultados afirmativos encontrados, respecto al sinergismo, en la combinación del 5-FU con los inhibidores de ChoK α nos han llevado a abordar el estudio de las

diferentes enzimas de la ruta del metabolismo del 5-FU. La figura 19 muestra las enzimas y los metabolitos implicados en la activación del mismo.

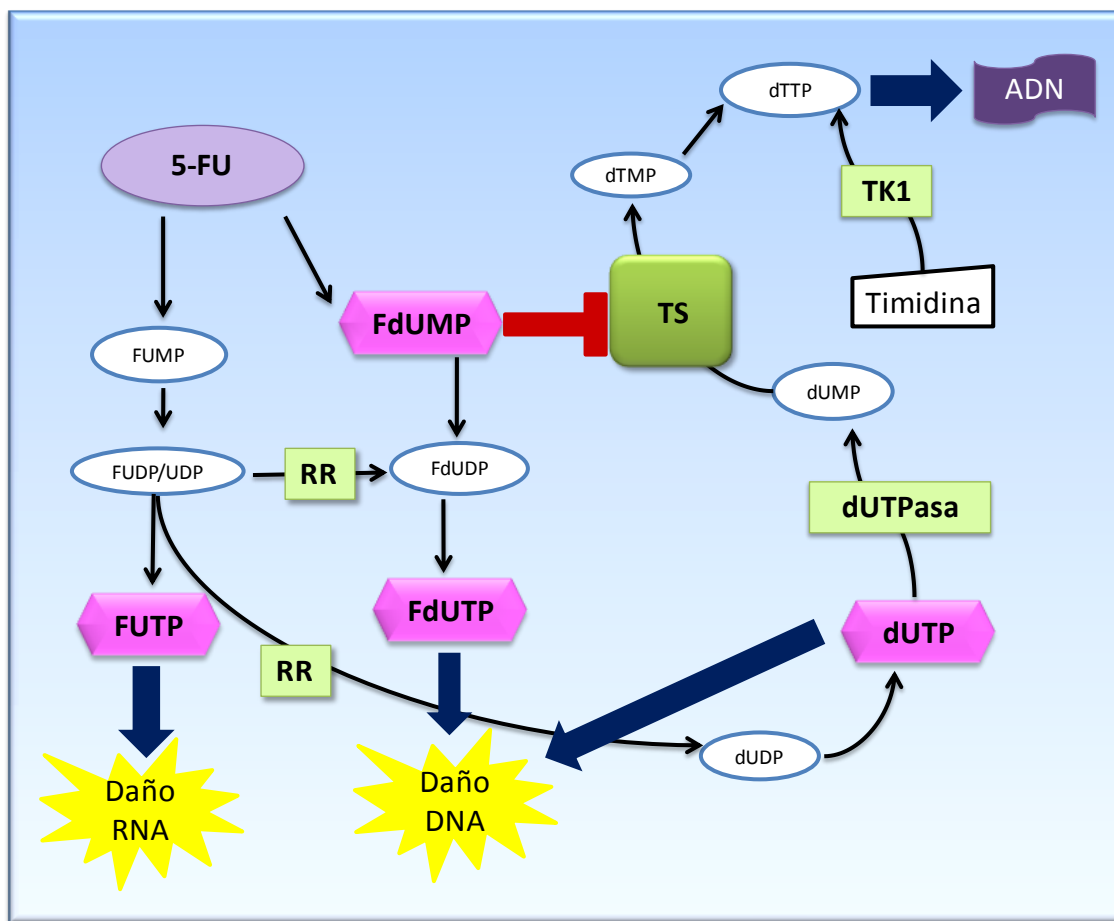


Figura 19. Ruta de metabolización de 5-FU. En negrita se muestran los metabolitos activos del 5-FU. METABOLITOS: **FUMP**: fluorouridina monofosfato; **FUDP/UDP**: fluorouridina difosfato/ uridina difosfato; **FUTP**: fluorouridina trifosfato; **FdUMP**: fluorodesoxiuridina monofosfato; **FdUDP**: fluorodesoxiuridina difosfato; **dUMP**: desoxiuridina monofosfato; **FdUTP**: fluorodesoxiuridinaa trifosfato; **dUDP** desoxiuridina difosfato; **dUTP**: desoxiuridina trifosfato; **dTMP**: desoxitimidina monofosfato; **dTTP**: desoxitimidina trifosfato. ENZIMAS: **RR**: ribonucleótido reductasa; **dUTPasa**: desoxiuridina trifosfatasa; **TS**: timidilato sintasa; **TK1**: timidina quinasa.

La timidilato sintasa es una enzima que tiene un papel fundamental en la síntesis de timidilato y por tanto del ADN, ya que cataliza la metilación de dUMP generando dTMP utilizando CH₂THF como donante de grupos metilo. Esta reacción es necesaria para la síntesis *de novo* de timidilato. Cuando el 5-FU entra en el interior de la célula es transformado en un análogo del nucleótido dUMP, FdUMP, que se une covalentemente a TS en presencia de CH₂THF (Carreras and Santi, 1995) formando un complejo ternario

estable. Este complejo bloquea la unión del sustrato normal dUMP inhibiendo la síntesis de dTMP (Longley et al., 2003).

Los estudios realizados para describir los mecanismos moleculares que producen muerte celular debido a la inhibición de TS, sugieren que la citotoxicidad resultante es debida a un proceso denominado muerte por privación de timina (“thymineless death”). Aunque inicialmente se postuló que la muerte celular iniciada por condiciones de ausencia de timina resultaba en una disminución de la síntesis de ADN provocada por depleción de las reservas de dTTP (Cohen, 1971), estudios más recientes sugieren que son múltiples factores los que contribuyen a la muerte celular por falta de timina y sobre todo al desequilibrio de las reservas de desoxirribonucleótidos trifosfato. Sin embargo, los niveles de dTMP disminuidos se pueden recuperar gracias a la acción de TK1 siendo una de las rutas más potentes de resistencia al 5-FU (Grem and Fischer, 1989).

Por otra parte, se ha descrito el carácter transformante de TS y su posible papel como oncoproteína, ya que células no transformadas transfectadas con TS adquieren un comportamiento de célula transformada (Rahman et al., 2004). Varios estudios han demostrado que los niveles de ARNm o proteicos de TS están aumentados en muchos tejidos tumorales comparado con su tejido normal (Rahman et al., 2004; Yasumatsu et al., 2010) y niveles elevados de TS están asociados con peor pronóstico y supervivencia (Johnston et al., 1994; Johnston et al., 1995; Nomura et al., 2002; Johnston et al., 2003; Mizutani et al., 2003; Costi et al., 2005; Ohrling et al., 2005). Además, una de las causas que desencadena la resistencia adquirida al 5-FU es el exceso de producción de TS como resultado de su amplificación génica por lo que sus niveles dan información de la sensibilidad al 5-FU (Lindebjerg et al., 2006; Yasumatsu et al., 2009).

La dTMP, que es el producto de la TS, se genera a partir de dUMP. Este sustrato procede de la acción de la enzima desoxiuridina trifosfatasa sobre dUTP. Niveles elevados de dUTP llevan a la incorporación errónea de grupos uracilo en el ADN, lo que provoca disminución del crecimiento celular y rotura de la doble hebra de ADN en respuesta a la inhibición del metabolismo de timidilato (Melnyk et al., 1999).

El uracilo no es un componente nativo del ADN, aunque puede encontrarse en él por un proceso espontáneo de desaminación de residuos de citosina, catalizado por la enzima dCMP desaminasa o a través de la utilización del dUTP por las ADN polimerasas

durante la replicación. En condiciones normales, el ADN se mantiene libre de uracilo gracias a la acción combinada de dos enzimas: la desoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa) y la uracil-ADN glicosilasa (UDG) que elimina los residuos de uracilo del ADN. Cuando la acumulación de dUTP y FdUTP, superan la actividad de la enzima dUTPasa por lo que el ratio dUTP: dTTP aumenta y el dUTP se incorpora en el ADN que se está replicando, la célula entra en ciclos repetidos de incorporación de uracilo y reparación mediada por UDG. Si esta situación se mantiene en el tiempo se inicia el proceso de muerte celular. Por esto, la dUTPasa tiene un papel esencial como regulador las reservas de dUTP y su expresión podría tener gran importancia en el uso de antitumorales basados en su inhibición.

Ladner y col. realizaron un estudio en el que analizaron los niveles de expresión de dUTPasa y la asociación con supervivencia y respuesta a la quimioterapia en 20 pacientes con cáncer de colon metastásico tratados con infusión de 5-FU/LV (Ladner et al., 2000). En este estudio demostraron que los niveles de expresión de la dUTPasa elevados en el núcleo estaban asociados a resistencia al tratamiento con 5-FU y a una menor supervivencia. También, variaciones en los niveles de dUTPasa sirven como factor pronóstico de la eficacia de los inhibidores de TS, ya que limitan los niveles de dUTP previniendo la incorporación de uracilo en el ADN disminuyendo los efectos de muerte celular derivados de la incorporación errónea del nucleótido.

En nuestro estudio se demuestra que los inhibidores de ChoK α inducen una potente disminución de los niveles de TS contribuyendo de manera sinérgica al daño celular producido por el tratamiento con 5-FU. Pero no solo producen la modulación de estas enzimas que tienen un papel clave en la ruta del 5-FU, sino que también disminuyen otras enzimas como la dUTPasa y la RRM2.

Por tanto, estos resultados sugieren que el sinergismo observado entre 5-FU y los inhibidores de ChoK α puede estar motivado por la modulación de varias enzimas de la ruta del 5-FU de forma coordinada.

La pauta secuencial utilizada se corresponde con la implicación de los inhibidores de ChoK α en el mecanismo de acción del 5-FU, ya que tratando primero las células con MN58b o RSM932A se produce una disminución de ARNm con su consecuente disminución de los niveles proteicos. El tratamiento posterior con el 5-FU inactivaría el resto de la TS remanente en la célula. En la figura 20 se muestra la ruta metabólica de

FdUMP y se ve como en condiciones en las que la cantidad de TS libre es elevada, la TS puede seguir actuando y la célula continúa proliferando. Sin embargo, cuando hay una disminución de los niveles de TS, la FdUMP recluta prácticamente toda la enzima inhibiendo la proliferación celular.

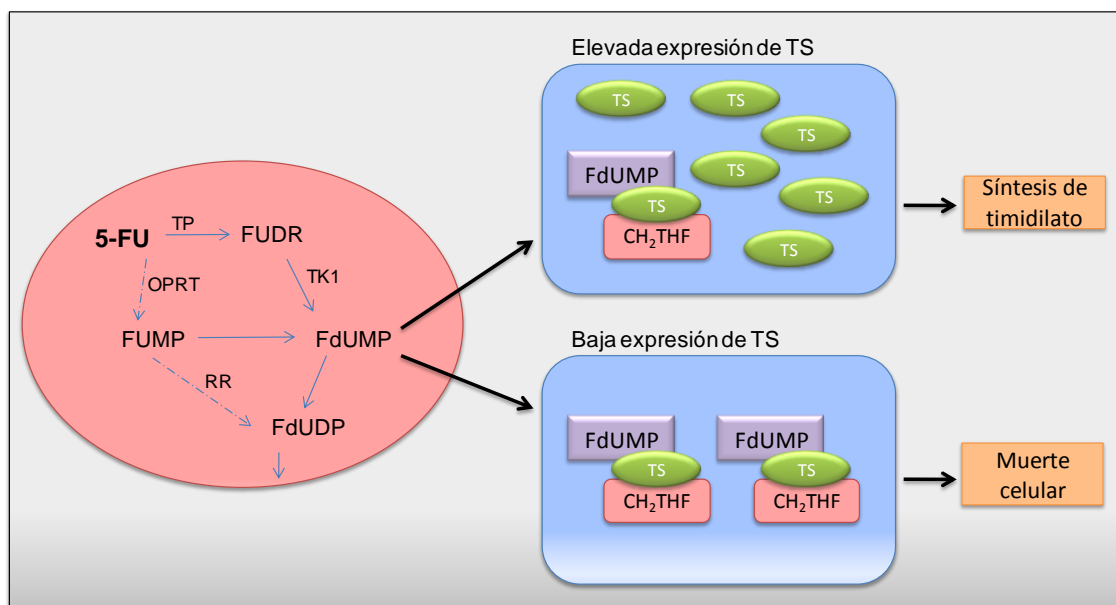


Figura 20. Ruta de síntesis de FdUMP y mecanismo de inhibición de TS. En la parte izquierda de la figura se muestra un resumen de la ruta metabólica de síntesis de FdUMP. TP: timidina fosforilasa; TK1: timidina quinasa; OPRT: orotato fosforribosiltransferasa; RR: ribonucleótido reductasa. En la parte derecha arriba se expone uno de los mecanismos más importantes de resistencia al 5-FU. Un elevado número de moléculas de TS se traduce en un aumento de resistencia al FdUMP. Mientras que si los niveles de TS son bajos la célula será inhibida por FdUTP causando muerte celular. Adaptado de (Showalter et al., 2008)

La acción combinatoria de los inhibidores de ChoK α y el 5-FU es por tanto muy efectiva ya que con 5-FU se consigue solamente una inactivación parcial de la enzima, pero gracias a la acción paralela de los inhibidores de ChoK α se consigue prácticamente una depleción completa de TS.

Por otra parte, el tratamiento con 5-FU disminuye los niveles de dTMP por lo que la célula pone en marcha un mecanismo de supervivencia que consiste en atraer timidina del medio extracelular al interior de la célula, donde se convierte en dTMP por acción de la TK1 (Grem and Fischer, 1989), con lo que disminuye la efectividad del 5-FU. El mecanismo de supervivencia asociado a la actividad TK1 supone uno de los principales mecanismos de resistencia al 5-FU (West et al., 2004).

De acuerdo con las fases en las que actúa cada fármaco, el esquema de administración que induce un mayor efecto es el secuencial, empezando con los

inhibidores de ChoK α de acuerdo con el mecanismo de acción previamente identificado, lo que indica que los inhibidores de ChoK α contribuyen a la acción del 5-FU disminuyendo la expresión de TS.

Como se ha explicado anteriormente, la dUTPasa es responsable de mantener el balance dUTP/dUMP y un exceso de dUTP hace que éste se intercale en el ADN en el lugar de la dTTP generando un ADN erróneo. Como se ha demostrado en este trabajo, los inhibidores de ChoK α disminuyen los niveles de dUTPasa por lo que aumenta dUTP. Por otra parte, el 5-FU se transforma en el nucleótido erróneo, FdUTP, y se intercala de manera incorrecta en el ADN al igual que dUTP. Por tanto, al combinar la acción de ambos fármacos se está produciendo una acumulación de nucleótidos erróneos provocando mayor daño en el ADN.

Respecto a la RRM2, subunidad de la ribonucleótido reductasa (RR), se ha demostrado que los niveles y la actividad de esta enzima están aumentados en diversos tipos de tumores y contribuye a un mayor potencial tumorigénico. El tratamiento de células tumorales con inhibidores de ribonucleótido reductasa da como resultado una disminución del balance de desoxirribonucleótidos trifosfato, que mantenido durante un tiempo prolongado conduce a la célula a apoptosis (Rosenberger et al., 2000; Chabes et al., 2003).

Fan y colaboradores (Fan et al., 1998) encontraron que la enzima RRM2 tiene un papel importante en la transformación maligna pues aumenta el crecimiento de colonias independiente de anclaje de células transformadas por los oncogenes *v-fms*, *v-src*, *A-raf*, *v-fes*, *c-myc*. La sobreexpresión de la subunidad R2 de la proteína recombinante RR de ratón que es homóloga a la humana, provocó un aumento significativo de la expresión de la quinasa Raf-1, un aumento de la actividad de la MAPK2 (Mitogen Activated Protein Kinase 2) y en la activación de Rac-1 elevando el potencial metastásico de las células NIH 3T3 (Fan et al., 1996). Además, la sobreexpresión de RRM2 aumenta la expresión de la metaloproteinasas de la matriz 9 (MMP-9) (Duxbury and Whang, 2007), que está asociada con crecimiento tumoral y metástasis (Zucker and Vacirca, 2004; Liu et al., 2011). Incluso se ha asociado con angiogénesis al disminuir los niveles de factor antiangiogénico trombospodina 1 (TSP-1) y aumentar los del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Zhang et al., 2009). También, el aumento de los niveles de RRM2, a nivel de

ARNm y proteína, han sido asociado con resistencia a fármacos como la gemcitabina (Zhou and Yen, 2001).

Puesto que esta proteína tiene gran relevancia en el desarrollo tumorigénico y está implicada en síntesis de nucleótidos, decidimos estudiar sus niveles con MN58b y RSM932A. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con los inhibidores de ChoK α disminuyen los niveles de RRM2 a nivel del ARNm.

La timidilato sintasa no solo es una diana importante en CCR, sino que en pulmón también y se ha asociado su aumento a peor respuesta a fármacos cuya diana es TS (Oguri et al., 2005; Ozasa et al., 2010). Se ha descrito que la combinación del inhibidor de EGFR, gefitinib, con 5-FU en cáncer de pulmón es sinérgica (Okabe et al., 2008). Los autores estudiaron los niveles de E2F1 y TS al tratar con gefitinib y observaron que los niveles de estas proteínas disminuían, atribuyendo el sinergismo a la disminución de E2F1 y TS, provocada por el bloqueo de EGFR. En otro trabajo en el que se combinaron el inhibidor de TS, pemetrexed, y el inhibidor de c-Src, dasatinib, en líneas de CPNM, se demostró sinergismo al combinar ambos fármacos (Ceppi et al., 2011). Observaron que dasatinib disminuye la expresión de TS mientras que pemetrexed inhibe la actividad. Por lo que sugieren que el efecto sinérgico al combinarlos es debido a la reducción de los niveles de TS, y que TS y c-Src pertenecen a una ruta común. Además, estudiaron los niveles de TS en 94 muestras de pacientes con CPNM, observando una correlación entre los niveles de la enzima y la activación de la tirosina quinasa, c-Src.

Recientemente se ha publicado que ChoK α forma un complejo con EGFR dependiente de c-Src (Miyake and Parsons, 2011). ChoK α interacciona con el dominio quinasa de EGFR y es fosforilada en los residuos tirosina 197 y 333 de manera dependiente de c-Src. Los fármacos que inhiben EGFR y c-Src, gefitinib y dasatinib, tienen en común con los inhibidores de ChoK α la disminución de los niveles de TS por lo que puede ser que estos fármacos ejerzan esta acción a través de la formación del complejo entre ChoK α , EGFR y c-Src.

Nuestro estudio sienta las bases de una nueva terapia combinatoria en CCR basada en la combinación de inhibidores de ChoK α con el 5-FU. El compuesto RSM932A señala el potencial interés del diseño en combinatoria con 5-FU en todos los tumores sólidos en los que el 5-FU constituya el estándar de quimioterapia. Así mismo, se sugiere

un papel importante de los inhibidores de ChoK α en CCR o en otras patologías en las que el 5-FU sea la base del tratamiento antitumoral.

6.2 Cáncer de pulmón

El tratamiento quimioterápico del CPNM está basado en la combinación de cisplatino con otros fármacos antitumorales de segunda y tercera generación como taxol, gemcitabina o vinorelbina. Recientemente, se han implantado también regímenes de primera línea con gefitinib en aquellos pacientes con tumores con mutaciones en el EGFR y se están introduciendo terapias basadas en derivados del platino con docetaxel, erlotinib y pemetrexed.

Los fármacos más utilizados en la terapia de los CPNM comparten mecanismos de resistencia comunes con cisplatino aumentando las posibilidades de que el tratamiento fracase. Esta es la base de la búsqueda de nuevas estrategias alternativas que mejoren la eficacia de los tratamientos quimioterápicos en esta patología, y fundamentalmente que presenten mecanismos de acción complementarios a los establecidos en la clínica.

Como se ha descrito en la introducción, los niveles de ChoK α están elevados en CPNM y la determinación de los niveles de expresión tiene valor pronóstico en fases tempranas (Ramírez de Molina et al, 2007). Además, células derivadas de tumores de pulmón son sensibles al tratamiento con inhibidores de ChoK α , tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Ramírez de Molina et al, 2007; resultados no publicados).

La implicación de colina quinasa en CPNM justifica el uso de sus inhibidores como fármacos antitumorales en CPNM. MN58b, nuestro fármaco cabeza de serie mejor estudiado, ha sido el candidato elegido para este estudio en CPNM.

En primer lugar se analizó la resistencia intrínseca de los tumores de los pacientes tanto a MN58b como a otros quimioterápicos convencionales (cisplatino, taxol, vinorelbina y gemcitabina). Los resultados obtenidos se analizaron en comparaciones bilaterales mediante la correlación de Pearson y se observó que el MN58b no comparte los mecanismos de resistencia con ninguno de los otros fármacos utilizados.

Apoyando esta propuesta, hemos encontrado que al estudiar la sensibilidad en células hechas resistentes a MN58b y RSM932A, (H460 MN58R y H460 RSM932AR), por tratamiento continuado con concentraciones crecientes del fármaco, permite confirmar que no existe relación cruzada entre los mecanismos de resistencia de los inhibidores de ChoK α y cisplatino, sugiriendo una nueva alternativa de tratamiento en CPNM centrada en la combinación de estos dos fármacos.

Finalmente, el estudio del efecto de la combinación de los inhibidores de ChoK α con cisplatino demuestra que tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* se produce una potente sinergia entre ambos fármacos. Por tanto, podemos afirmar que en el tratamiento de CPNM podría ser adecuada la administración de fármacos inhibidores de ChoK α en combinación con una terapia basada en platino, pues podría mejorarse la tasa de respuesta en este tipo de cáncer, que aún mantiene una alta tasa de mortalidad con los esquemas de tratamientos actuales.

Conclusiones

7 Conclusiones

1. La combinación de inhibidores de ChoK α y 5-FU en líneas tumorales derivadas de CCR muestran una potente actividad antiproliferativa sinérgica *in vitro* y una potenciación de la actividad antitumoral *in vivo*, sugiriendo su potencial uso como nueva alternativa terapéutica para pacientes con CCR
2. Los inhibidores de ChoK α inducen una reducción drástica de los niveles de ARNm de varias enzimas fundamentales en el metabolismo de 5-FU incluyendo a TS, , dUTPasa y RRM2, potenciando su efecto sobre la inducción de muerte celular del 5-FU.
3. La combinación de inhibidores de ChoK α y cisplatino en líneas tumorales derivadas de CPNM muestran una potente actividad antiproliferativa sinérgica *in vitro* y una potenciación de la actividad antitumoral *in vivo*, sugiriendo su potencial uso como nueva alternativa terapéutica para pacientes con CPNM.
4. No existe correlación entre la resistencia a inhibidores de ChoK α en tumores de CPNM y a cisplatino, sugiriendo su potencial uso combinado en pacientes de CPNM.
5. Una terapia basada en la inhibición de ChoK α es una prometedora estrategia antitumoral, con el potencial de ser utilizada sola o en combinatoria con otros fármacos convencionales, tanto en cáncer colorrectal como en cáncer de pulmón no microcítico.

Bibliografía

8 Bibliografía

- Al-Saffar NM, Troy H, Ramirez de Molina A, Jackson LE, Madhu B, Griffiths JR, Leach MO, Workman P, Lacal JC, Judson IR, Chung YL. 2006. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitor MN58b in human carcinoma models. *Cancer Res* 66:427-434.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:1626-1634.
- Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y. 2000. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 60:6921-6926.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90:675-684.
- Aoyama C, Ishidate K, Sugimoto H, Vance DE. 2007. Induction of choline kinase alpha by carbon tetrachloride (CCl₄) occurs via increased binding of c-jun to an AP-1 element. *Biochim Biophys Acta* 1771:1148-1155.
- Aoyama C, Liao H, Ishidate K. 2004. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 43:266-281.
- Bandres E, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Bitarte N, Gariia-Foncillas J. 2007. Pharmacogenomics in colorectal cancer: the first step for individualized-therapy. *World J Gastroenterol* 13:5888-5901.
- Banez-Coronel M, Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Sarmentero J, Ramos MA, Garcia-Cabezas MA, Garcia-Oroz L, Lacal JC. 2008. Choline kinase alpha depletion selectively kills tumoral cells. *Curr Cancer Drug Targets* 8:709-719.
- Baselga J. 2002. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 7 Suppl 4:2-8.
- Bhakoo KK, Williams SR, Florian CL, Land H, Noble MD. 1996. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. *Cancer Res* 56:4630-4635.
- Burt RW, Barthel JS, Dunn KB, David DS, Drelichman E, Ford JM, Giardiello FM, Gruber SB, Halverson AL, Hamilton SR, Ismail MK, Jasperson K, Lazenby AJ, Lynch PM, Martin EW, Jr., Mayer RJ, Ness RM, Provenzale D, Rao MS, Shike M, Steinbach G, Terdiman JP, Weinberg D. 2010. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *J Natl Compr Canc Netw* 8:8-61.

- Campos J, del Carmen Nunez M, Rodriguez V, Entrena A, Hernandez-Alcoceba R, Fernandez F, Lacal JC, Gallo MA, Espinosa A. 2001. LUMO energy of model compounds of bispyridinium compounds as an index for the inhibition of choline kinase. *Eur J Med Chem* 36:215-225.
- Cannon JG. 1994. Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogs and congeners. *Med Res Rev* 14:505-531.
- Carreras CW, Santi DV. 1995. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu Rev Biochem* 64:721-762.
- Casado-Vela J, Cebrian A, Gomez Del Pulgar MT, Lacal JC. 2011. Approaches for the study of cancer: towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics. *Clin Transl Oncol* 13:617-628.
- Ceppi P, Rapa I, Lo Iacono M, Righi L, Giorcelli J, Pautasso M, Bille A, Ardisson F, Papotti M, Scagliotti GV. 2011. Expression and pharmacological inhibition of thymidylate synthase and Src kinase in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*.
- Clem BF, Clem AL, Yalcin A, Goswami U, Arumugam S, Telang S, Trent JO, Chesney J. 2011. A novel small molecule antagonist of choline kinase- α that simultaneously suppresses MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene* 30:3370-3380.
- Cohen SS. 1971. On the nature of thymineless death. *Ann N Y Acad Sci* 186:292-301.
- Compton CC, Greene FL. 2004. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 54:295-308.
- Contractor KB, Kenny LM, Stebbing J, Challapalli A, Al-Nahhas A, Palmieri C, Shousha S, Lewis JS, Hogben K, De Nguyen Q, Coombes RC, Aboagye EO. 2011. Biological basis of [11C]choline-positron emission tomography in patients with breast cancer: comparison with [18F]fluorothymidine positron emission tomography. *Nucl Med Commun*.
- Costi MP, Ferrari S, Venturelli A, Calo S, Tondi D, Barlocco D. 2005. Thymidylate synthase structure, function and implication in drug discovery. *Curr Med Chem* 12:2241-2258.
- Chabes A, Georgieva B, Domkin V, Zhao X, Rothstein R, Thelander L. 2003. Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* 112:391-401.
- Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55.
- Chua BT, Gallego-Ortega D, Ramirez de Molina A, Ullrich A, Lacal JC, Downward J. 2009. Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer* 8:131.
- De Castro-Carpeno J, Belda-Iniesta C, González Barón M. 2010. Carcinoma no microcítico de pulmón: aspectos generales. In: Permanger P, editor. *Tratado de Oncología*, 2009 P. Permanger ed.

- Diaz-Rubio E. 2004. New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers. *Oncologist* 9:282-294.
- Douillard JY, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, Diaz-Rubio E, Santoro A, Van Cutsem E. 2003. Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. *Ann Oncol* 14 Suppl 2:ii7-12.
- Duxbury MS, Whang EE. 2007. RRM2 induces NF-kappaB-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 354:190-196.
- Eastman A. 1987. Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interact* 61:241-248.
- Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. 2002. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 20:1721-1728.
- Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. 1986. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol* 31:229-234.
- Fan H, Villegas C, Huang A, Wright JA. 1998. The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. *Cancer Res* 58:1650-1653.
- Fan H, Villegas C, Wright JA. 1996. Ribonucleotide reductase R2 component is a novel malignancy determinant that cooperates with activated oncogenes to determine transformation and malignant potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14036-14040.
- Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*.
- Galiatsatos P, Foulkes WD. 2006. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101:385-398.
- Gallego-Ortega D, del Pulgar TG, Valdes-Mora F, Cebrian A, Lacal JC. 2011. Involvement of human choline kinase alpha and beta in carcinogenesis: a different role in lipid metabolism and biological functions. *Adv Enzyme Regul* 51:183-194.
- Gallego-Ortega D, Ramirez de Molina A, Ramos MA, Valdes-Mora F, Barderas MG, Sarmentero-Estrada J, Lacal JC. 2009. Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment. *PLoS One* 4:e7819.
- Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Letourneau Y, Coudert B, Bertheaut-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam R, Misset JL, Levi F. 2000. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:136-147.

- Glunde K, Raman V, Mori N, Bhujwalla ZM. 2005. RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation. *Cancer Res* 65:11034-11043.
- Glunde K, Serkova NJ. 2006. Therapeutic targets and biomarkers identified in cancer choline phospholipid metabolism. *Pharmacogenomics* 7:1109-1123.
- Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR. 2004. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22:23-30.
- Grem JL, Fischer PH. 1989. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole. *Pharmacol Ther* 40:349-371.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. 2000. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 342:69-77.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J. 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179:663-666.
- Hernandez-Alcoceba R, Fernandez F, Lacal JC. 1999. In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res* 59:3112-3118.
- Hernandez-Alcoceba R, Saniger L, Campos J, Nunez MC, Khaless F, Gallo MA, Espinosa A, Lacal JC. 1997. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* 15:2289-2301.
- Hernando E, Sarmentero-Estrada J, Koppie T, Belda-Iniesta C, Ramirez de Molina V, Cejas P, Ozu C, Le C, Sanchez JJ, Gonzalez-Baron M, Koutcher J, Cordon-Cardo C, Bochner BH, Lacal JC, Ramirez de Molina A. 2009. A critical role for choline kinase- α in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene* 28:2425-2435.
- Hersey P, Zhang XD, Mhaidat N. 2008. Overcoming resistance to apoptosis in cancer therapy. *Adv Exp Med Biol* 615:105-126.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. 1995. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 20:191-197.
- Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dolo V, Canevari S, Podo F. 2005. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res* 65:9369-9376.

- Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Pisanu ME, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwalla ZM, Mezzanzanica D, Canevari S, Podo F. 2010. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 70:2126-2135.
- Ishidate K, Tsuruoka M, Nakazawa Y. 1980. Induction of choline kinase by polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 96:946-952.
- Jamieson ER, Lippard SJ. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 99:2467-2498.
- Johnston PG, Benson AB, 3rd, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, Allegra CJ. 2003. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *J Clin Oncol* 21:815-819.
- Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, Chabner BA, Allegra CJ. 1994. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12:2640-2647.
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. 1995. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55:1407-1412.
- Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. 2007. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357:2040-2048.
- Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. 2005. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23:3706-3712.
- Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N. 1991. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 51:3237-3242.
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science* 280:1036-1037.
- Kitchens ME, Forsthoefel AM, Barbour KW, Spencer HT, Berger FG. 1999. Mechanisms of acquired resistance to thymidylate synthase inhibitors: the role of enzyme stability. *Mol Pharmacol* 56:1063-1070.
- Lacal JC. 1990. Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes after microinjection of p21ras proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol Cell Biol* 10:333-340.
- Lacal JC. 2001. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs* 4:419-426.
- Lacal JC, Moscat J, Aaronson SA. 1987. Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature* 330:269-272.

- Ladner RD, Lynch FJ, Groshen S, Xiong YP, Sherrod A, Caradonna SJ, Stoecklacher J, Lenz HJ. 2000. dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Res* 60:3493-3503.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.
- Leyton J, Smith G, Zhao Y, Perumal M, Nguyen QD, Robins E, Arstad E, Aboagye EO. 2009. [18F]fluoromethyl-[1,2-2H4]-choline: a novel radiotracer for imaging choline metabolism in tumors by positron emission tomography. *Cancer Res* 69:7721-7728.
- Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26:374-379.
- Lindblom A. 2001. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol* 13:63-69.
- Lindebjerg J, Nielsen JN, Hoeffding LD, Bisgaard C, Brandslund I, Jakobsen A. 2006. Expression of thymidylate synthase in primary colorectal adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14:37-41.
- Liu X, Lai L, Wang X, Xue L, Leora S, Wu J, Hu S, Zhang K, Kuo ML, Zhou L, Zhang H, Wang Y, Zhou B, Nelson RA, Zheng S, Zhang S, Chu P, Yen Y. 2011. Ribonucleotide reductase small subunit M2B prognoses better survival in colorectal cancer. *Cancer Res* 71:3202-3213.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3:330-338.
- Lloveras J, Hamza M, Chap H, Douste-Blazy L. 1985. Action of hemicholinium-3 on phospholipid metabolism in Krebs II ascites cells. *Biochem Pharmacol* 34:3987-3993.
- Macara IG. 1989. Elevated phosphocholine concentration in ras-transformed NIH 3T3 cells arises from increased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol* 9:325-328.
- Machover D, Diaz-Rubio E, de Gramont A, Schilf A, Gastiaburu JJ, Brienza S, Itzhaki M, Metzger G, N'Daw D, Vignoud J, Abad A, Francois E, Gamelin E, Marty M, Sastre J, Seitz JF, Ychou M. 1996. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann Oncol* 7:95-98.
- Melnyk S, Pogribna M, Miller BJ, Basnakian AG, Pogribny IP, James SJ. 1999. Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett* 146:35-44.
- Miyake T, Parsons SJ. 2011. Functional interactions between Choline kinase alpha, epidermal growth factor receptor and c-Src in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*.

- Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, Fukushima M, Nonomura M, Nakao M, Miki T. 2003. Significance of thymidylate synthase activity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:1453-1460.
- Mori N, Glunde K, Takagi T, Raman V, Bhujwalla ZM. 2007. Choline kinase down-regulation increases the effect of 5-fluorouracil in breast cancer cells. *Cancer Res* 67:11284-11290.
- Nakagami K, Uchida T, Ohwada S, Koibuchi Y, Morishita Y. 1999a. Increased choline kinase activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 90:1212-1217.
- Nakagami K, Uchida T, Ohwada S, Koibuchi Y, Suda Y, Sekine T, Morishita Y. 1999b. Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 90:419-424.
- Nomura T, Nakagawa M, Fujita Y, Hanada T, Mimata H, Nomura Y. 2002. Clinical significance of thymidylate synthase expression in bladder cancer. *Int J Urol* 9:368-376.
- Oguri T, Achiwa H, Bessho Y, Muramatsu H, Maeda H, Niimi T, Sato S, Ueda R. 2005. The role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in resistance to 5-fluorouracil in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 49:345-351.
- Ohrling K, Edler D, Hallstrom M, Ragnhammar P, Blomgren H. 2005. Detection of thymidylate synthase expression in lymph node metastases of colorectal cancer can improve the prognostic information. *J Clin Oncol* 23:5628-5634.
- Okabe T, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Iwasa T, Yoshida T, Hatashita E, Yamada Y, Satoh T, Tamura K, Fukuoka M, Nakagawa K. 2008. Synergistic antitumor effect of S-1 and the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines: role of gefitinib-induced down-regulation of thymidylate synthase. *Mol Cancer Ther* 7:599-606.
- Ozasa H, Oguri T, Uemura T, Miyazaki M, Maeno K, Sato S, Ueda R. 2010. Significance of thymidylate synthase for resistance to pemetrexed in lung cancer. *Cancer Sci* 101:161-166.
- Peltomaki P, Vasen H. 2004. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 20:269-276.
- Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, Smid K, Lunec J, Calvert AH, Marsh S, McLeod HL, Bloemena E, Meijer S, Jansen G, van Groeningen CJ, Pinedo HM. 2002. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1587:194-205.
- Podo F, Ferretti A, Knijn A, Zhang P, Ramoni C, Barletta B, Pini C, Baccarini S, Pulciani S. 1996. Detection of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NIH-3T3 fibroblasts and their H-ras transformants: NMR and immunochemical studies. *Anticancer Res* 16:1399-1412.
- Popat S, Houlston RS. 2005. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 41:2060-2070.

- Popat S, Matakidou A, Houlston RS. 2004. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 22:529-536.
- Quint LE, Tummala S, Brisson LJ, Francis IR, Krupnick AS, Kazerooni EA, Iannettoni MD, Whyte RI, Orringer MB. 1996. Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 62:246-250.
- Rahman L, Voeller D, Rahman M, Lipkowitz S, Allegra C, Barrett JC, Kaye FJ, Zajac-Kaye M. 2004. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. *Cancer Cell* 5:341-351.
- Ramirez de Molina A, Banez-Coronel M, Gutierrez R, Rodriguez-Gonzalez A, Olmeda D, Megias D, Lacal JC. 2004. Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer Res* 64:6732-6739.
- Ramirez de Molina A, Gallego-Ortega D, Sarmentero J, Banez-Coronel M, Martin-Cantalejo Y, Lacal JC. 2005. Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 65:5647-5653.
- Ramirez de Molina A, Gutierrez R, Ramos MA, Silva JM, Silva J, Bonilla F, Sanchez JJ, Lacal JC. 2002a. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene* 21:4317-4322.
- Ramirez de Molina A, Penalva V, Lucas L, Lacal JC. 2002b. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene* 21:937-946.
- Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F, Rosell R, Lacal J. 2002c. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 296:580-583.
- Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Penalva V, Lucas L, Lacal JC. 2001. Inhibition of ChoK is an efficient antitumor strategy for Harvey-, Kirsten-, and N-ras-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285:873-879.
- Ramirez de Molina A, Sarmentero-Estrada J, Belda-Iniesta C, Taron M, Ramirez de Molina V, Cejas P, Skrzypski M, Gallego-Ortega D, de Castro J, Casado E, Garcia-Cabezas MA, Sanchez JJ, Nistal M, Rosell R, Gonzalez-Baron M, Lacal JC. 2007. Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol* 8:889-897.
- Ratnam S, Kent C. 1995. Early increase in choline kinase activity upon induction of the H-ras oncogene in mouse fibroblast cell lines. *Arch Biochem Biophys* 323:313-322.
- Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez de Molina A, Banez-Coronel M, Megias D, Lacal JC. 2005. Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. *Int J Oncol* 26:999-1008.

- Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez de Molina A, Fernandez F, Lacal JC. 2004. Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. *Oncogene* 23:8247-8259.
- Rosenberger G, Fuhrmann G, Grusch M, Fassl S, Elford HL, Smid K, Peters GJ, Szekeres T, Krupitza G. 2000. The ribonucleotide reductase inhibitor trimidox induces c-myc and apoptosis of human ovarian carcinoma cells. *Life Sci* 67:3131-3142.
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. 2000. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6:1322-1327.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirotta N, Elfring GL, Miller LL. 2000. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 343:905-914.
- Schmitz JC, Chen TM, Chu E. 2004. Small interfering double-stranded RNAs as therapeutic molecules to restore chemosensitivity to thymidylate synthase inhibitor compounds. *Cancer Res* 64:1431-1435.
- Schmitz JC, Liu J, Lin X, Chen TM, Yan W, Tai N, Gollerkeri A, Chu E. 2001. Translational regulation as a novel mechanism for the development of cellular drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 20:33-41.
- Showalter SL, Showalter TN, Witkiewicz A, Havens R, Kennedy EP, Hucl T, Kern SE, Yeo CJ, Brody JR. 2008. Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. Is it time to move forward? *Cancer Biol Ther* 7:986-994.
- Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ. 2001. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 21:3075-3079.
- Teegarden D, Taparowsky EJ, Kent C. 1990. Altered phosphatidylcholine metabolism in C3H10T1/2 cells transfected with the Harvey-ras oncogene. *J Biol Chem* 265:6042-6047.
- Trigo Perez JM, Garrido Lopez P, Felip Font E, Isla Casado D. 2010. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small-cell lung cancer: an updated edition. *Clin Transl Oncol* 12:735-741.
- Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. 2007. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25:1658-1664.
- Van Cutsem E, Pozzo C, Starkhammar H, Dirix L, Terzoli E, Cognetti F, Humblet Y, Garufi C, Filez L, Gruia G, Cote C, Barone C. 1998. A phase II study of irinotecan alternated with five days bolus of 5-fluorouracil and leucovorin in first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 9:1199-1204.

- Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141.
- West CM, Jones T, Price P. 2004. The potential of positron-emission tomography to study anticancer-drug resistance. *Nat Rev Cancer* 4:457-469.
- Wittenberg J, Kornberg A. 1953. Choline phosphokinase. *J Biol Chem* 202:431-444.
- Wong E, Giandomenico CM. 1999. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 99:2451-2466.
- Wu G, Sher RB, Cox GA, Vance DE. 2009. Understanding the muscular dystrophy caused by deletion of choline kinase beta in mice. *Biochim Biophys Acta* 1791:347-356.
- Wu G, Sher RB, Cox GA, Vance DE. 2010. Differential expression of choline kinase isoforms in skeletal muscle explains the phenotypic variability in the rostrocaudal muscular dystrophy mouse. *Biochim Biophys Acta* 1801:446-454.
- Xi Y, Nakajima G, Schmitz JC, Chu E, Ju J. 2006. Multi-level gene expression profiles affected by thymidylate synthase and 5-fluorouracil in colon cancer. *BMC Genomics* 7:68.
- Yalcin A, Clem B, Makoni S, Clem A, Nelson K, Thornburg J, Siow D, Lane AN, Brock SE, Goswami U, Eaton JW, Telang S, Chesney J. 2010. Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene* 29:139-149.
- Yamane N, Makino M, Kaibara N. 1999. S-phase accumulation precedes apoptosis induced by preoperative treatment with 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cells. *Cancer* 85:309-317.
- Yasumatsu R, Nakashima T, Uryu H, Ayada T, Wakasaki T, Kogo R, Masuda M, Fukushima M, Komune S. 2009. Correlations between thymidylate synthase expression and chemosensitivity to 5-fluorouracil, cell proliferation and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Chemotherapy* 55:36-41.
- Yasumatsu R, Nakashima T, Wakasaki T, Ayada T, Kadota H, Masuda M, Toh S, Shiratsuchi H, Komune S. 2010. Relative level of thymidylate synthase mRNA expression in primary tumors and normal tissues predicts survival of patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267:581-586.
- Zhang K, Hu S, Wu J, Chen L, Lu J, Wang X, Liu X, Zhou B, Yen Y. 2009. Overexpression of RRM2 decreases thrombospondin-1 and increases VEGF production in human cancer cells in vitro and in vivo: implication of RRM2 in angiogenesis. *Mol Cancer* 8:11.
- Zhou B, Yen Y. 2001. Characterization of the human ribonucleotide reductase M2 subunit gene; genomic structure and promoter analyses. *Cytogenet Cell Genet* 95:52-59.
- Zucker S, Vacirca J. 2004. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23:101-117.

Anexo
